



**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Medicina**

TESIS DOCTORAL

**DIAGNÓSTICO DEL ASMA:  
UTILIDAD DE LA BRONCOPROVOCACIÓN  
Y  
DE LA MEDICIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO**

Memoria presentada por **María Pedrosa Delgado** para acceder al grado  
de Doctor en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de  
Madrid

**Directores de Tesis:**  
**Dr. Santiago Quirce Gancedo**  
**Dr. Rodolfo Álvarez-Sala Walther**

Hospital Universitario La Paz  
Universidad Autónoma de Madrid

MADRID, 2015



## **AGRADECIMIENTOS**



*Es de bien nacidos ser agradecidos*

Mi primer agradecimiento es para mis padres, Rafa y Loli. No solo por lo evidente, que ya es mucho, sino por haber inculcado en mí, cada uno a su manera, el amor por el trabajo. A mi madre le agradezco su sacrificio y su valentía, el haberme transmitido su amor por las letras, su resolución, su pragmatismo y su visión crítica. A mi padre le agradezco haber sido el mejor ejemplo de tesón y de inquebrantable voluntad y dedicación por el trabajo, el amor por la ciencia, pero, sobre todo, por el método científico; y haberme transmitido su gran curiosidad, que es la necesaria semilla de la investigación. A los dos os agradezco haber sido siempre más exigentes conmigo de lo que tocaba, porque eso me ha hecho ser inconformista y competitiva, que no competidora.

A mi Jefe y director, Santiago, por su incansable, pero siempre amable y discreto empuje para que terminara esta tesis. Por sus sabios consejos y sus siempre constructivas críticas, por las oportunidades, el apoyo y la confianza que siempre ha tenido en mí.

A mi otro director, Rodolfo, por sus comentarios y sus muy apreciados consejos, por recibirme siempre con una sonrisa amable y no esconderse cuando le he perseguido con prisas para que corrigiera esta tesis.

A Pilar y Valentín, por que sin ellos nada de esto habría sido posible. Por los ratos entre provocaciones, por su generosidad, tanto laboral como personal, por las horas dedicadas a este trabajo y su esfuerzo.

A Teresa, Maite y Carmen que han sido siempre un modelo a seguir por su dedicación, su constancia, su rigor y el amor por el trabajo bien hecho. Por enseñarme a ser paciente, virtud de la que carezco. Por un montón de oportunidades que espero no haber desaprovechado. Por contar conmigo para tantas cosas en las que espero no haberos defraudado.

Al resto de mis compañeros del Servicio de Alergia, por los buenos ratos que hemos pasado y los que pasaremos, porque cada uno de vosotros me ha enseñado algo que no sabía.

Al Hospital, porque desde hace doce años es mi casa.

A todas las personas con las que he tenido el gusto de trabajar durante estos años, a las residentes pasadas y presentes que nos impulsan para estar siempre al día y nos transmiten su frescura y sus ganas de aprender.

A mi marido, Juanito, por estar siempre a mi lado, porque siempre tiene palabras de aliento en el momento justo, por entender mi pasión por la ciencia, por su comprensión en las largas horas delante del ordenador, por enseñarme que nunca hay que rendirse y ser el perfecto ejemplo de fuerza de voluntad.

## Índice

<b>PRÓLOGO</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>DEFINICIÓN DE ASMA</b>	<b>9</b>
<b>FISIOPATOLOGÍA DEL ASMA</b>	<b>10</b>
LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL ASMA	11
LA HIPERRESPUESTA BRONQUIAL Y LA REMODELACIÓN	20
<b>DIAGNÓSTICO DE ASMA</b>	<b>25</b>
MEDICIÓN DE LA HIPERRESPUESTA BRONQUIAL: PROVOCACIÓN BRONQUIAL INESPECÍFICA	28
MEDICIÓN DE LA INFLAMACIÓN BRONQUIAL	44
<b>DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO</b>	<b>56</b>
LA PROVOCACIÓN BRONQUIAL ESPECÍFICA	56
<b>OBJETIVO</b>	<b>63</b>
<b>PACIENTES Y MÉTODOS</b>	<b>67</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>75</b>
<b>COMPARISON OF METHACHOLINE AND ADENOSINE INHALATION CHALLENGE IN PATIENTS WITH SUSPECTED ASTHMA</b>	<b>77</b>
ABSTRACT	79
INTRODUCTION	81
METHODS	82
RESULTS	86

DISCUSSION	90
REFERENCES	93
<b><u>CAPÍTULO 2</u></b>	<b><u>95</u></b>
<b>USEFULNESS OF EXHALED NITRIC OXIDE FOR DIAGNOSING</b>	
<b>ASTHMA</b>	<b>97</b>
ABSTRACT	99
INTRODUCTION	101
METHODS	103
RESULTS	106
DISCUSSION	110
REFERENCES	114
<b><u>CAPÍTULO 3</u></b>	<b><u>117</u></b>
<b>CHANGES IN EXHALED NITRIC OXIDE LEVELS AFTER BRONCHIAL</b>	
<b>ALLERGEN CHALLENGE</b>	<b>119</b>
ABSTRACT	121
INTRODUCTION	123
METHODS	125
RESULTS	129
DISCUSSION	134
REFERENCES	137
<b><u>DISCUSIÓN GENERAL</u></b>	<b><u>143</u></b>
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>161</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b><u>165</u></b>



## PRÓLOGO



Esta tesis se presenta como un recopilación de publicaciones científicas de las que la candidata a Doctor es primera autora, de acuerdo con las normas de presentación de tesis doctoral del Programa de Doctorado del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Esta tesis consta de una introducción general en la que se revisa el estado actual del diagnóstico del asma, objetivos, breve descripción de pacientes y métodos, un resumen de los resultados de los trabajos, los tres artículos originales, una discusión general y unas conclusiones.

Estos trabajos publicados abordan el diagnóstico del asma y la utilidad de las técnicas de broncoprovocación con agentes indirectos y de la medición de la fracción de óxido nítrico exhalado en pacientes con síntomas sugestivos de asma así como en la monitorización de la respuesta bronquial tras provocación bronquial específica con alérgeno.



## INTRODUCCIÓN



## ***Definición de asma***

El asma es una enfermedad heterogénea, habitualmente caracterizada por una inflamación crónica de la vía aérea. Se define por la presencia de síntomas respiratorios como sibilantes, disnea, opresión torácica y tos, que varían a lo largo del tiempo en intensidad, junto con una limitación variable del flujo aéreo (1). Esta definición de consenso se basa en la consideración de las características que son típicas del asma y que la distinguen de otras enfermedades respiratorias. En su patogenia intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada por factores genéticos (2).

Se caracteriza por los síntomas descritos y la limitación variable del flujo espiratorio. Tanto los síntomas como la limitación del flujo aéreo característicamente varían en intensidad a lo largo del tiempo. Estas variaciones, a menudo están desencadenadas por factores como el ejercicio, la exposición a alérgenos o irritantes, cambios de tiempo o infecciones víricas del tracto respiratorio.

Los síntomas y la limitación al flujo aéreo se resuelven espontáneamente o en respuesta al tratamiento y pueden estar ausentes durante semanas o meses. Por otra parte, los pacientes suelen experimentar exacerbaciones episódicas que, en algunas ocasiones, pueden llegar a comprometer la vida. El asma habitualmente se asocia a la hiperrespuesta bronquial a estímulos directos o indirectos, y a la presencia de inflamación crónica de la vía aérea

(1,2). Estos hechos suelen ser persistentes, incluso cuando el individuo está asintomático, o tiene una función pulmonar normal.

## ***Fisiopatología del asma***

Los hechos fundamentales en la fisiopatología del asma son la inflamación de la vía aérea, el aumento de la respuesta broncoconstrictora a estímulos inespecíficos y una obstrucción variable al flujo aéreo. Esto condiciona cambios estructurales a largo plazo que se conocen como remodelación.

La patogenia del asma es compleja. Las interacciones entre los factores genéticos, epigenéticos y ambientales predisponen a los pacientes al desarrollo de patrones inmunológicos regulatorios disfuncionales que, a la postre, condicionan la presentación de los diferentes síntomas y manifestaciones clínicas.

Según estudios en gemelos se estima que la herencia es responsable de hasta un 60% del desarrollo de asma (3-5). Los trabajos de asociación genómica (GWAS: *genome-wide association studies*) han identificado varios genes candidatos que están potencialmente involucrados en la patogenia del asma, pero también con la atopia, los niveles séricos de IgE total o diferentes factores de crecimiento y de interleucinas (IL) (6-8). No obstante, la interacción genes-ambiente modula la susceptibilidad genética para el fenotipo relacionado con el asma (9,10). Protocolos con ratones han demostrado que la exposición alérgica induce cambios epigenéticos asociados con genes involucrados en respuestas Th1 y Th2 (11). Varias



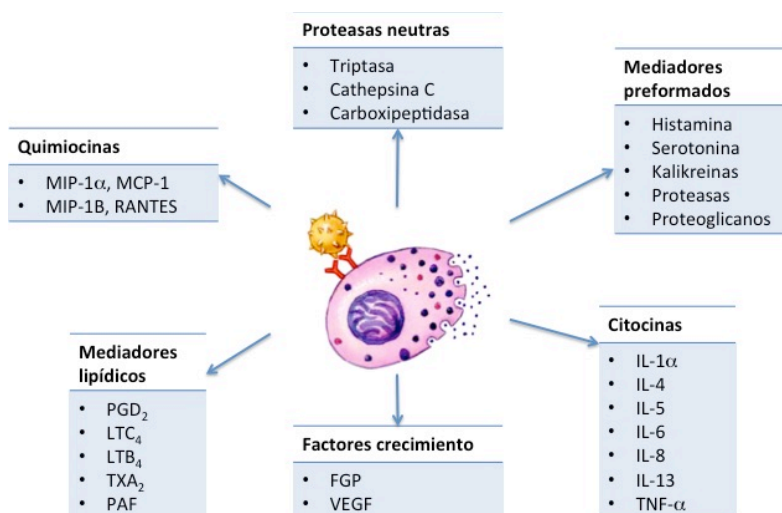
exposiciones ambientales se han relacionado con el desarrollo de asma, como el virus respiratorio sincitial (12). Por el contrario, la exposición temprana a un amplio repertorio microbiano se ha asociado con una menor probabilidad de aparición de asma (13,14), aunque el mecanismo por el que esto se desencadena no está claro.

### **La respuesta inflamatoria en el asma**

La afectación de la vía aérea en los procesos alérgicos se debe a una regulación inmunológica aberrante en individuos susceptibles como respuesta específica a un alérgeno. Esto supone la activación *in situ* de células inflamatorias o el reclutamiento de las mismas hacia la vía aérea. Las células implicadas incluyen mastocitos, macrófagos, eosinófilos, linfocitos T, células dendríticas, basófilos, neutrófilos y plaquetas (15). Asimismo las células estructurales como células epiteliales, células musculares lisas, células endoteliales y fibroblastos son también capaces de sintetizar y liberar mediadores inflamatorios (16–18).

En el asma alérgica está implicada una reacción de hipersensibilidad tipo I en la que inmunoglobulinas de clase E (IgE) específicas frente al alérgeno se unen a sus receptores de alta afinidad (FcεRI) de basófilos y mastocitos presentes en las capas subepiteliales de la vía aérea (19). Esto inicia una secuencia de reacciones bioquímicas y cambios morfológicos en la célula, que resultan en la exocitosis de los gránulos secretores que contienen histamina y otros mediadores preformados; la síntesis y secreción de

mediadores lipídicos formados *de novo*, como prostaglandinas (PG) y leucotrienos (LT); y la síntesis y secreción de citoquinas (**Figura 1**).

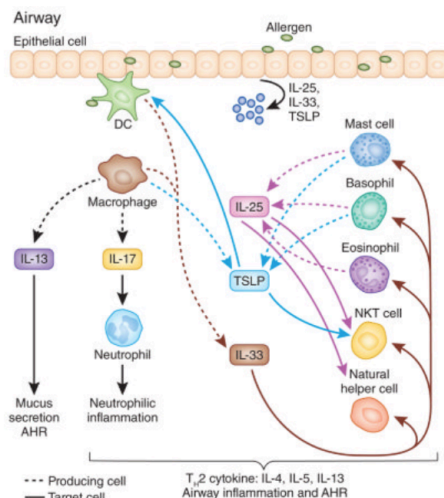


**Figura 1.** Mediadores liberados por mastocitos

PGD<sub>2</sub>: prostaglandina D<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>: leucotrieno C<sub>4</sub>. PAF: factor activador de plaquetas, FGF: factor de crecimiento de fibroblastos, VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular, MIP: proteína inflamatoria de macrófago, RANTES: regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted, MCP-1: proteína quimiotáctica de monocito-1

Estos mediadores son capaces de ocasionar la contracción del músculo liso bronquial, causar edema y secreción de moco que contribuye al estrechamiento de la vía aérea.

Los cambios patogénicos de los que se derivan la inflamación, la hiperrespuesta bronquial y la remodelación están mediados por diferentes células de la vía aérea y células involucradas en la respuesta inmunitaria (**Figura 2**).



**Figura 2.** Respuestas del huésped en la patogenia del asma. Tomado de Kim HY, De Kruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptative immunity. Nat Immunol 2010; 11: 577-84

IL: interleucina; TSLP: linfopoyetina tímica estromal

- a. **Células epiteliales de la vía aérea.** Las células epiteliales son las células principales que forman la barrera contra el estrés mecánico y oxidativo, los alérgenos, los agentes contaminantes e infecciones, así como frente al daño de sustancias endógenas. También tienen un papel importante en el aclaramiento muco-ciliar y en la señalización de varios tipos de receptores de patrones de reconocimiento, incluidos los receptores *Toll-like 4* (TLR-4). Éstos son expresados en las células epiteliales, poniendo en marcha tanto

respuestas alérgicas como frente a estímulos infecciosos (20). En el asma, las citoquinas y quimiocinas derivadas de células epiteliales, incluyendo IL-25, IL-33, linfopoyetina tímica estromal (TSLP) y factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF), estimulan a células efectoras (basófilos, eosinófilos, mastocitos y linfocitos) y a células dendríticas para poner en marcha los patrones de respuesta inmunitaria tras contacto con alérgenos, contaminantes o agentes infecciosos (21). Las células epiteliales también son productoras de mediadores, citoquinas (IL-5, GM-CSF), quimiocinas (RANTE/CCL5, eotaxina/CCL11 y MCP-1/CCL2), factores de crecimiento y otros mediadores tales como el óxido nítrico (NO).

- b. **Células dendríticas.** Al igual que las epiteliales, las células dendríticas están expuestas directamente al ambiente exterior. Las células dendríticas pulmonares actúan como células presentadoras de antígeno y expresan una gran variedad de receptores de reconocimiento de patrones en su superficie celular. Las células dendríticas además pueden reclutar eosinófilos localmente (20). Las células dendríticas también pueden ser reclutadas a la vía aérea en respuesta a alérgenos y microorganismos patógenos (22,23). Pueden ser directamente estimuladas por la unión de alérgenos o agentes infecciosos directamente en su superficie, o ser estimuladas de forma indirecta por las células epiteliales (a través

de mediadores como IL-25, IL-33, TSLP, GM-CSF) (24). Su migración a través del sistema linfático a los ganglios linfáticos está mediada por múltiples factores, incluyendo el receptor C-C de quimiocina tipo 7 (CCR7), CCR8 y CCRL2 (25,26). Las células dendríticas afectan también a la diferenciación de células T y, bajo determinadas circunstancias, generan una respuesta Th2, característica del asma de base atópica (27).

- c. **Linfocitos T.** Varias subpoblaciones de células T son importantes en el asma. Los linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de citoquinas Th2 tienden a predominar con niveles característicamente elevados de IL-4, IL-5 e IL-13 (28). IL-4 e IL-13 promueven la inflamación a través de la señalización de eosinófilos y células B, y la remodelación a través de la señalización de fibroblastos, células musculares lisas, células dendríticas y células epiteliales (29). IL-4 es esencial para la diferenciación de células Th2 y es crítica tanto en la producción de IgE como en la expresión de receptores de baja afinidad para la IgE en linfocitos B, así como para la expresión de receptores de alta afinidad en mastocitos y basófilos. El mecanismo por el que actúa IL-4 es a través de la unión a su receptor IL-4R que activa el factor de transcripción nuclear STAT-6. De hecho, en pacientes asmáticos se ha visto un aumento de la expresión tanto de STAT-6 como de GATA-3, que participan en la generación de citoquinas (30,31). IL-4 además induce la formación de cisteinil-LT

(cis-LT) a partir de mastocitos e induce la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1) en el endotelio, lo que tiene efecto quimiotáctico para eosinófilos, basófilos y linfocitos. La IL-4, junto con la IL-13, también induce la producción de eotaxina. La IL-5 es esencial para la supervivencia y la maduración de linfocitos B y, junto con la IL-3 y GM-CSF, promueve la diferenciación y maduración de eosinófilos. IL-13, junto a IL-4, promueve el cambio de isotipo hacia IgE, la adhesión de eosinófilos al endotelio vascular y la respuesta Th2. La IL-13 además, induce la secreción de moco y provoca hiperrespuesta bronquial al unirse a sus receptores en las células musculares de la vía aérea. Algunos pacientes con asma, sin embargo, muestran un predominio de linfocitos Th1. Este patrón se desarrolla por la presencia de IL-18 e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y se caracteriza por una elevada producción del mismo (32). Las células Th17, que son linfocitos T CD4+ que expresan IL-17, también juegan un papel en una parte de los pacientes con asma. Este patrón, aunque infrecuente, resulta en un predominio de neutrófilos como célula efectora principal (33,34). Las células Th9, linfocitos T CD4+ secretores de IL-9 que se encuentran elevadas en pacientes atópicos y que promueven la respuesta alérgica, probablemente a través de la activación de mastocitos, también tienen un papel importante (35). Por último, las células T reguladoras, que segregan factor de crecimiento transformador  $\beta$

(TGF- $\beta$ ), IL-10 y citoquinas antiinflamatorias son importantes por su papel atenuador de la respuesta alérgica (36,37).

- d. **Linfocitos B.** Los linfocitos B son importantes en el asma por producir IgE, IL-5 y factor activador de células B que promueven la supervivencia de las mismas. Bajo la influencia de IL-4 o IL-13, las células B se unen a células T (a través del CD40 y CD40L respectivamente) para que sean activadas y produzcan IgE, generalmente en los ganglios linfáticos regionales. La IgE segregada se une a la superficie de mastocitos y basófilos a través del receptor de alta afinidad Fc $\epsilon$ RI. Cuando la IgE está unida al alérgeno, causa la degranulación y liberación de mediadores de estas células (38).
- e. **Células linfoides innatas.** Son un tipo de leucocito efector recientemente descubierto, que es estimulado por IL-25 e IL-33 y requiere la transcripción de factor ROR $\alpha$  para la señalización. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en macrófagos y granulocitos a la vez que liberan notables cantidades de citoquinas Th2 y estimulan eosinófilos (39).
- f. **Eosinófilos.** Los eosinófilos son granulocitos generados en la médula ósea, que juegan un papel fundamental en el asma. La biología del eosinófilo es compleja y el efecto de sus productos de secreción, diverso. La diferenciación en la médula está mediada por IL-13, IL-5 y GM-CSF (40). El reclutamiento de eosinófilos está mediado por IL-13, histamina, PG del tipo 2 y eotaxinas, a través del

receptor CCR3 (41). En el fenómeno de reclutamiento de eosinófilos se han identificado numerosas moléculas implicadas. En la superficie del eosinófilo se expresan integrinas como las integrinas  $\beta_2$  y el antígeno asociado a la función de linfocitos 1 (LFA-1) que es una integrina  $\alpha_1\beta_2$ , y se encuentra elevada en eosinófilos de pacientes atópicos tras provocación bronquial específica. Ambas tienen alta afinidad por la ICAM-1 presente en la superficie del endotelio vascular. Además la integrina  $\alpha_1\beta_7$  o antígeno tardío (VLA-4), selectiva del eosinófilo, se une a VCAM-1 y es importante para la adhesión inicial de eosinófilo al endotelio. La integrina  $\alpha_M\beta_2$  o Mac-4 también es importante en la extravasación del eosinófilo, al igual que LFA-1 (42). La migración del eosinófilo es estimulada, entre otros, por RANTES, MCP-4 y las eotaxinas 1, 2 y 3 que actúan de forma sinérgica con IL-5. La supervivencia de los eosinófilos es promovida por IL-5 y su apoptosis señalizada a través de los receptores siglek-8 y siglek-F (43,44). Los eosinófilos segregan una importante cantidad de mediadores lipídicos y proteínas relevantes en la inmunobiología del asma, como el factor activador de plaquetas (PAF), cis-LT (LTC4, LTD4, LTE4) que tienen un potente efecto broncoconstrictor y promueven el reclutamiento de células inflamatorias. Además liberan proteínas granulares citotóxicas, como la proteína catiónica del eosinófilo (ECP), la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN), la peroxidasa del



eosinófilo (EPO) y la proteína básica mayor (MBP) que induce daño en el epitelio bronquial e hiperrespuesta bronquial. Los eosinófilos segregan citoquinas y quimiocinas, como TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF y RANTES, que promueven la inflamación Th2 y el daño del epitelio de la vía aérea (45,46). El eosinófilo es capaz de modular la respuesta inflamatoria no sólo por la liberación de proteínas citotóxicas y mediadores lipídicos de la inflamación, sino porque son capaces de generar y liberar gran cantidad de reactivos intermediarios de oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxil) y de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) (47,48), así como enzimas degradativas como la elastasa, colagenasa y ribonucleasas que afectan a la estructura pulmonar (49,50).

- g. **Mastocitos.** Los mastocitos y basófilos son las células efectoras más importantes en el asma ya que poseen receptores de alta afinidad para IgE (Fc $\epsilon$ RI). Estas células, mantenidas cerca de las superficies mucosas por IL-9, pueden ser activadas por la unión del factor de células madre al receptor de superficie del c-kit, por la unión de IgE o de tirosina-kinasa (51). Los mastocitos activados son una fuente importante de TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, quimiocinas, factores de crecimiento, histamina, cis-LT y PG (52). Cuando el alérgeno se une a la IgE fijada en la superficie de un mastocito, ocasiona la liberación de los mediadores preformados del interior de los gránulos (Figura 2). Estas sustancias son responsables de la

fase inmediata de la reacción alérgica, y tienen un papel fundamental en la broncoconstricción, vasodilatación e inician la cascada de la inflamación alérgica. Tras el estímulo alérgeno-específico, se sintetizan otros mediadores derivados de ácido araquidónico, como LT y tromboxanos, que actúan como factores quimiotácticos de eosinófilos, linfocitos B, T, neutrófilos y basófilos que contribuyen a mantener la respuesta inflamatoria.

- h. **Neutrófilos.** Los neutrófilos, reclutados a través de Th17 son importantes en un subtipo de asma que no responde a corticosteroides inhalados (53). No obstante, el papel de los neutrófilos en la patogenia del asma ha sido difícil de probar, ya que el uso de corticosteroides inhalados suprime la eosinofilia en la vía aérea y esto puede resultar en una sobreestimación de los neutrófilos (54–56).

## **La hiperrespuesta bronquial y la remodelación**

En el asma hay un aumento de la sensibilidad de la vía aérea a distintos estímulos, lo que causa broncoespasmo en respuesta a agentes que no afectan a los sujetos sanos. Este aumento de la sensibilidad se denomina hiperrespuesta bronquial (HRB). La HRB es un hecho característico que se puede hallar virtualmente en todos los pacientes con asma (57). No obstante, hay una variabilidad considerable en la intensidad de la HRB tanto

entre individuos como en el mismo paciente en diferentes momentos de la enfermedad. El grado de HRB se ha relacionado con la gravedad del asma (58,59), de forma que los pacientes con asma más grave tendrían una mayor HRB, pero esta correlación es débil y, por lo tanto, no se usa en la evaluación clínica de la gravedad.

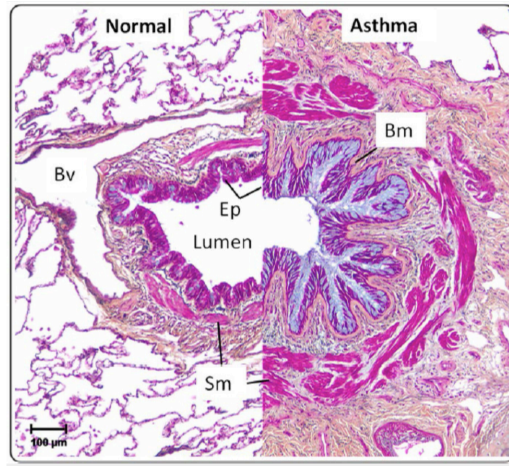
Los factores que intervienen en el desarrollo de HRB pueden clasificarse en persistentes y variables (58,60). Los factores persistentes de la HRB son atribuidos a los cambios estructurales en la vía aérea, que incluyen el engrosamiento subendotelial de la membrana basal, la hipertrofia del músculo liso bronquial y alteraciones vasculares. Estos cambios alteran la arquitectura de la vía aérea y la hacen más gruesa, menos distensible y más estrecha, lo que determina un mayor grado de constricción tras estímulos con agentes broncoconstrictores.

El componente variable de la HRB, sin embargo, está relacionado con la inflamación de la vía aérea como resultado de infecciones respiratorias, exposición a alérgenos o el tratamiento recibido por el paciente.

Aunque ambos procesos están estrechamente relacionados, hay estudios en los que se demuestra que es el *status* estructural, y no necesariamente la inflamación, lo que determina la HRB (61,62).

El proceso de remodelación de la vía aérea se refiere a una multitud de cambios estructurales que ocurren en el asma e incluyen el daño epitelial, el engrosamiento de la membrana basal, un aumento en el espesor del músculo liso bronquial, metaplasia de células caliciformes y un aumento de

la angiogénesis y linfangiogénesis (63) y concluye con cambios en el depósito de tejido conectivo y alteración estructural de la vía aérea (**Figura 3**).



**Figura 3.** Sección histológica de la vía aérea de un paciente sin asma (izquierda) y un paciente con asma grave (derecha), teñido con tinción pentacromática de Movat. En la imagen derecha el epitelio (Ep) muestra hiperplasia mucosa e hipersecreción (azul) y engrosamiento de la membrana basal (Bm). El músculo liso (Sm) está aumentado. Reproducido de Wadsworth B, Yang J, Dorscheid D. IL-13, asthma and glycosilation in airway epithelial repair. In: Chang C, ed. Carbohydrates: comprehensive studies on glycobiology and glycotechnology. InTech, 2012

Los procesos que se desarrollan incluyen desdiferenciación, migración celular, diferenciación y maduración de células estructurales (64). En el proceso de reestructuración se combina el daño epitelial con la reparación epitelial prolongada y la sobreproducción de factores de crecimiento profibrótico (TGF- $\beta$ ), así como la proliferación y diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos que liberan factores de crecimiento,

quimiocinas, y citoquinas que inducen la proliferación de células musculares lisas y aumentan la permeabilidad muscular y las redes neuronales.

- a. **Daño epitelial.** Varios estudios han evidenciado el daño epitelial, incluida la alteración de las uniones estrechas (*zonula occludens*) y denudación celular que ocurre en el epitelio de la vía aérea en el asma (65–67). Se ha demostrado que las células epiteliales producen mecanismos de reparación rápidos e inician cascadas de señales en respuesta a varios estímulos (68,69). Este proceso está en parte mediado por el factor de crecimiento epitelial (70). También se ha puesto de manifiesto la existencia de un proceso de reparación anormal y una disminución de la función de barrera (67).
- b. **Engrosamiento de la membrana basal.** El engrosamiento de la capa reticular de la membrana basal, parece estar mediado por miofibroblastos, se ha objetivado en biopsias de pacientes con asma (71). Se debe al depósito de colágenos I, II, III, V y de fibronectina, generada por los miofibroblastos activados (72). La relevancia funcional de este hecho no está clara ya que no se ha demostrado que se correlacione con la función pulmonar o el patrón de citoquinas Th2 (73,74). El papel del tejido conectivo fuera de la membrana basal tampoco está claro, no obstante parece ser

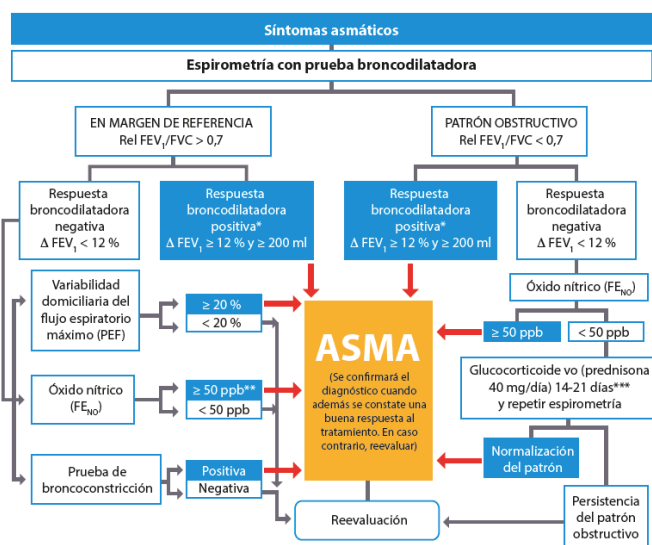
responsable de la disminución de la retracción elástica que causa hiperinsuflación pulmonar (75).

- c. **Músculo liso bronquial.** El incremento de la masa de músculo liso bronquial es un hecho reconocido en el asma desde hace décadas. Esta hipertrofia está mediada en parte por la liberación de cis-LT por parte de los eosinófilos. El músculo liso tiene un papel fundamental en la broncoconstricción que está desencadenada por diferentes estímulos directos e indirectos, y contribuye al desarrollo de síntomas, exacerbaciones y al proceso de remodelación bronquial (76,77). La hipertrofia de músculo liso bronquial se asocia con un elevado nivel de factores de crecimiento, incluyendo en TGF- $\beta$  y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (78,79). El músculo por sí mismo puede también actuar como un órgano secretorio en el asma, promoviendo un crecimiento inadaptado y la respuesta inmunológica. Parece que los mediadores más importantes en este proceso son IL-5, IL-13, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (77).
- d. **Metaplasia de células caliciformes.** La metaplasia de células caliciformes es otro cambio estructural importante en el asma. Este hecho se ha observado en modelos de asma Th2, pero no en modelos de asma Th1 (80,81). Este proceso es dependiente del receptor del factor de crecimiento epidérmico y de IL-13, y está inhibido por INF- $\gamma$  (82). La fase efectora final de la hipersecreción

de moco está mediada por la activación de canales dependientes de calcio (83).

## Diagnóstico de asma

El diagnóstico del asma comienza con una historia clínica y la valoración de síntomas sugestivos como tos, disnea, sibilantes u opresión torácica (Tabla 1). La confirmación del diagnóstico se hará mediante pruebas de función pulmonar que permitan evaluar la obstrucción bronquial, reversibilidad, variabilidad e HRB (1), así como la inflamación de la vía respiratoria (Figura 4).



**Figura 4.** Algoritmo para el diagnóstico de asma. Tomado de GEMA 4.0 (84)

\*En niños, un incremento del 12% es suficiente para considerarla positiva aunque sea menor de 200 ml. \*\*En los casos en los que la prueba de broncoconstricción sea negativa debe considerarse el diagnóstico de bronquitis eosinofílica. \*\*\*Como alternativa pueden utilizarse glucocorticoides inhalados a dosis muy altas, 1500-2000 µg de fluticasona, en tres o cuatro tomas diarias, durante 2-8 semanas

**Tabla 1.** Criterios diagnósticos de asma (Modificado de GINA 2014)

Hecho diagnóstico	Criterio para el diagnóstico de asma
<b>1. Historia de síntomas respiratorios</b>	
Sibilantes, disnea, opresión torácica y tos.	<p>Generalmente, más de un tipo de síntoma.</p> <p>Los síntomas ocurren de forma variable en el tiempo y en intensidad.</p> <p>Los síntomas empeoran por la noche o al despertar.</p> <p>Los síntomas son desencadenados por ejercicio, risa, alérgenos, frío.</p> <p>Los síntomas aparecen o empeoran con las infecciones víricas.</p>
<b>2. Confirmación de la limitación variable del flujo aéreo espiratorio</b>	
Variabilidad excesiva en la función pulmonar documentada* Y limitación del flujo aéreo documentada*.	<p>Cuanto mayores son las variaciones o más frecuentes son, más probable es el diagnóstico.</p> <p>Al menos una vez, durante el proceso diagnóstico, cuando el FEV<sub>1</sub> está bajo, confirmar que FEV<sub>1</sub>/FVC está disminuido (normal &gt;0,75-0,80 en adultos, &gt;0,90 en niños).</p>
Respuesta broncodilatadora positiva	<p>Adultos: incremento del FEV<sub>1</sub> &gt;12% y &gt; 200 mL del valor basal, tras 10-15 minutos tras 200-400 mcg salbutamol o equivalente.</p> <p>Niños: aumento del FEV<sub>1</sub> &gt;12% del predicho.</p>
Variabilidad excesiva en la medición de PEF dos veces al día, durante 2 semanas.	<p>Adultos: variabilidad media diaria diurna del PEF &gt;10%**.</p> <p>Niños: variabilidad media diaria diurna del PEF &gt;13%**.</p>
Incremento significativo de la función pulmonar tras 4 semanas de tratamiento anti-inflamatorio.	Adultos: aumento del FEV <sub>1</sub> >12% y >200 mL (PEF >20%) con respecto al basal tras 4 semanas de tratamiento antiinflamatorio y fuera de una infección respiratoria.
Test de esfuerzo positivo*	<p>Adultos: caída del FEV<sub>1</sub> &gt;10% y &gt;200mL del basal.</p> <p>Niños: caída del FEV<sub>1</sub> &gt;12% del predicho o PEF &gt;15%.</p>
Test de provocación bronquial positivo	Caída del FEV <sub>1</sub> >20% del basal con las dosis estándar de metacolina o histamina, o caída ≥15% con hiperventilación estandarizada o salino hipertónico o manitol.

\* Estos test se pueden repetir durante la presencia de síntomas o en la mañana. \*\* La variabilidad diurna diaria del PEF se calcula de la medición dos veces al día del PEF (PEF más alto del día – PEF más bajo del día /media del PEF más alto y más bajo) y se hace la media de una semana



Para la determinación de la obstrucción bronquial se utiliza la espirometría basal forzada, aunque en algunos casos puede ser normal. La reversibilidad de la obstrucción bronquial, aunque no se detecta en todos los casos, se comprueba mediante una prueba de broncodilatación (PBD) (84). No obstante, la PBD no predice la HRB en pacientes con sospecha de asma que tienen una espirometría normal (85). Por este motivo se debe determinar la HRB, que es especialmente útil para excluir el diagnóstico de asma ya que tiene un alto valor predictivo negativo (VPN). La HRB se determina mediante la evaluación de la función pulmonar de forma repetida tras inhalar concentraciones crecientes de diversos estímulos. La HRB se puede determinar usando métodos directos (como metacolina o histamina) que causan obstrucción al flujo aéreo a través de su acción directa sobre receptores muscarínicos del músculo liso bronquial, glándulas mucosas y microvascularización de la vía aérea; y métodos indirectos (ejercicio, adenosina, manitol, aerosoles no isotónicos) que actúan a través de la liberación de mediadores o citoquinas de células inflamatorias y neuronales que, secundariamente, producen broncoconstricción (86).

La inflamación de la vía aérea se puede valorar mediante el recuento de eosinófilos en esputo inducido (1). Dado que esta es una técnica que consume recursos y requiere personal técnico experimentado, se ha empleado la medición de la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO) como marcador no invasivo que se correlaciona razonablemente con la inflamación eosinofílica de la vía aérea (87).

## **Medición de la hiperrespuesta bronquial: provocación bronquial inespecífica**

La HRB se determina mediante curvas dosis-respuesta frente a agentes broncoconstrictores (88).

Según su mecanismo de acción, los diferentes agentes se clasifican en directos e indirectos (89).

- Directos: Desencadenan broncoconstricción actuando directamente sobre los receptores muscarínicos del músculo liso, glándulas mucosas y microvascularización de la vía aérea.
- Indirectos: Producen broncoespasmo a través de la activación de células inflamatorias y/o terminaciones nerviosas mediante la liberación de mediadores y citoquinas.

Debido a que los estímulos naturales que causan asma actúan a través de mecanismos indirectos, Pauwels et al. (89) postularon que la HRB a estímulos indirectos se correlaciona mejor con diversos aspectos clínicos del asma, incluida la gravedad, el control y la actividad de la enfermedad.

### ***Provocación bronquial con agonistas directos***

Las pruebas de provocación bronquial (PB) consisten en la administración sucesiva de dosis crecientes del agonista farmacológico elegido hasta que se obtiene un descenso determinado de la función pulmonar. Estas pruebas están estandarizadas (88,90,91), con recomendaciones respecto a la

selección de pacientes, elección del agonista, método de administración del mismo y el protocolo e interpretación de la respuesta (92).

Como agonistas directos se pueden utilizar histamina o metacolina. No obstante, el agonista farmacológico más comúnmente manejado es la metacolina puesto que sus resultados son más reproducibles que los de la histamina (93,94). La metacolina es un derivado sintético de la acetilcolina que únicamente tiene actividad muscarínica. Se presenta en forma de sal cristalina en polvo y su uso en humanos está aprobado por la FDA (Provocholine®, Laboratorios Diater, SA, Leganés, Madrid) (95).

La prueba de provocación bronquial con metacolina es muy útil en la práctica clínica, indicada en pacientes con síntomas sugestivos de asma con una espirometría normal y respuesta negativa a la PBD. Esta prueba resulta útil en el diagnóstico, por su elevado VPN, para excluir la enfermedad (96).

Previo a la prueba de provocación, se deben conocer sus contraindicaciones (**Tabla 2**), así como los fármacos y otras circunstancias que pueden modificar la respuesta (**Tabla 3**).

**Tabla 2.** Contraindicaciones para la prueba de provocación bronquial (92)

Contraindicaciones absolutas	Contraindicaciones relativas
Limitación importante al flujo aéreo (FEV <sub>1</sub> <50% del teórico o <1L en adultos)	Limitación importante al flujo aéreo (FEV <sub>1</sub> <65% del teórico o <1,5L en adultos)
Incapacidad técnica o funcional para las maniobras de espiración forzada reproducibles	Labilidad de la vía aérea
Hipersensibilidad a los fármacos empleados	Sospecha de alergia o intolerancia a los fármacos
Antecedente de IAM o ACVA reciente (<90 días)	Embarazo o lactancia
HTA no controlada (TAS>200 mmHg o TAD>100mmHg)	Uso de medicación que inhiba la colinesterasa
Aneurisma de aorta	Epilepsia o cardiopatía estable
Arritmia cardíaca sintomática o ICC	
Epilepsia inestable	

ACVA: accidente cerebrovascular agudo; HTA: hipertensión arterial; IAM: infarto agudo de miocardio; ICC: insuficiencia cardíaca congestiva; TAD: tensión arterial diastólica; TAS: tensión arterial sistólica

**Tabla 3.** Factores que alteran la hiperrespuesta bronquial (92,97)

<b>Aumentan la HRB</b>	<b>Período</b>
Sensibilización ocupacional	3 meses
Infecciones viales respiratorias	6 semanas
Vacunas de virus atenuados	3-6 semanas
Contaminantes atmosféricos	1 semana
Ejercicio intenso	4 horas
Humo de tabaco	2 horas
<b>Disminuyen la HRB</b>	<b>Período</b>
Astemizol	20 días
Bromuro de tiotropio	1 semana
Terfenadina/Cetirizina/Loratadina	5 días
Otros antihistamínicos	72 horas
Cromonas	48 horas
Teofilinas de acción larga	48 horas
Antagonistas del receptor de leucotrienos	24 horas
Beta adrenérgicos orales	24 horas
Beta adrenérgicos inhalados de acción larga	24 horas
Beta adrenérgicos inhalados de acción corta	12 horas
Bromuro de ipratropio	12 horas
Alimentos: café, té, cola, chocolate	El día de la prueba

## Sistemas de nebulización y método de la provocación bronquial

Para la realización de la provocación bronquial con metacolina se pueden utilizar dos métodos diferentes: el sistema de generación continua de aerosol y el sistema dosimétrico (92,97).

- a. **Sistema de generación continua** (98): se usa un nebulizador conectado a una fuente de aire comprimido que dispensa un flujo constante de 0,13-0,16 mL/min. El paciente respira a volumen corriente un tiempo fijo (aproximadamente 2 min) tras los cuales, transcurridos 30-90 seg, realiza una espirometría. Se administra inicialmente disolvente y luego concentraciones crecientes de metacolina desde 0,03 mg/mL hasta 16 mg/mL. La prueba de PB concluye cuando se alcanza una caída del  $FEV_1 > 20\%$  con respecto al diluyente. Una vez obtenida la respuesta, se administra un agonista  $\beta_2$ -adrenérgico de acción corta (salbutamol o terbutalina) para devolver al paciente a su condición basal.
- b. **Método dosimétrico**: se genera un aerosol durante la inspiración, generado de forma eléctrica mediante una válvula solenoide. El dosímetro nebuliza durante 0,6 seg en cada inspiración, produciendo un débito de  $9\mu \pm 10\%$ . En el protocolo de cinco inspiraciones con dosímetro se hacen cinco inspiraciones del fármaco a través del dosímetro. Inicialmente administra el diluyente y luego dosis crecientes de metacolina desde 0,0625 mg/L hasta 16 mg/mL (**Tabla 4**) (99,100). El paciente, desde

capacidad residual pulmonar, inspira lentamente hasta capacidad pulmonar total y mantiene una apnea de 5 seg. Tras 30-90 seg el paciente realizará una espirometría. Los mismos pasos se repetirán para las diferentes concentraciones. La conclusión de la prueba es igual a la descrita anteriormente. Existen otros métodos dosimétricos con otros protocolos (101,102), aunque la metodología es la misma que la ya descrita.

**Tabla 4.** Método de cinco inspiraciones con dosímetro (99)

<b>Etapas</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Número de inspiraciones</b>
1	Diluyente	5
2	0,0625	5
3	0,25	5
4	1	5
5	4	5
6	16	5

El método de respiración a volumen corriente produce una mayor respuesta que el dosimétrico. Hay dos razones que pueden explicar este hecho: la primera es que la dosis administrada en la respiración a volumen corriente es mayor, y la segunda y más importante es que las cinco inspiraciones máximas del método dosimétrico originan en sí mismas broncodilatación y esto tiene un efecto protector en sujetos con HRB leve a metacolina (103,104). No obstante, los resultados de ambos métodos son más

comparables en sujetos con HRB moderada o alta (59,105). La sensibilidad y el VPN de la técnica se aproxima al 100% cuando se usa el método de volumen corriente (106). La especificidad, sin embargo, no es tan buena, ya que una PB positiva puede darse en el caso de pacientes sin síntomas de asma. El VPP de una  $PC_{20} < 8 \text{ mg/mL}$  en una población aleatoria está por debajo del 50% (106). En el caso de una  $PC_{20} < 1 \text{ mg/mL}$  (HRB moderada) la especificidad y el VPP se aproximan al 100%. Por lo tanto, el VPP aumenta cuando la  $PC_{20}$  es baja.

También se eleva cuando se lleva a cabo en pacientes con una elevada probabilidad pre-test, es decir, aquellos que tienen síntomas de asma (92).

El método estandarizado recomendado por la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS) para la PB con metacolina es el método dosimétrico (92).

#### Interpretación de los resultados

El resultado se representa mediante una curva dosis respuesta que se construye con la dosis o concentración de metacolina en el eje de abscisas y la caída de  $FEV_1$  en el eje de ordenadas (92,97).

El parámetro para expresar los resultados es la  $PD_{20}$ , definida como la dosis acumulada que provoca una caída del  $FEV_1$  del 20% con respecto a la basal.



Se calcula mediante la fórmula (107):

$$PD_{20}: (20-R1) \times (D2-D1) / (R2-R1)$$

R1: porcentaje de FEV<sub>1</sub> inmediatamente anterior a la caída de FEV<sub>1</sub> ≥ 20%.

R2: porcentaje de FEV<sub>1</sub> inmediatamente posterior a la caída de FEV<sub>1</sub> ≥ 20%.

D1 es la dosis de metacolina inhalada en R1.

D2 es la dosis de metacolina inhalada en D2.

La PD<sub>20</sub> sólo se puede calcular cuando se utiliza un dosímetro. Para los sistemas de generación continua se utilizará la PC<sub>20</sub> en la que D1 y D2 se sustituyen por la concentración de agonista previa (C1) y posterior (C2) a la caída del FEV<sub>1</sub> del 20%.

Los valores de PC<sub>20</sub> y PD<sub>20</sub> permiten clasificar la intensidad de la HRB (Tabla 5) (97,108).

**Tabla 5.** Clasificación de la intensidad de la hiperrespuesta según los resultados de la provocación bronquial con metacolina

	PC <sub>20</sub> (mg/mL)	PD <sub>20</sub> (mg)
Normal	>16	>1
Dudosa	4-16	0,6-1
Leve	1-4	0,3-0,6
Grave	<1	<0,3

### ***Provocación bronquial con agonistas indirectos***

La ERS define el agente de provocación bronquial indirecto como aquel que actúa a través de la liberación de mediadores endógenos que causan la contracción del músculo liso, con o sin efecto a nivel de la microvascularización. La respuesta de estos agentes se ve modificada o completamente abolida por corticosteroides inhalados, lo que indica que tiene una mayor relación con la inflamación activa de la vía aérea (86). Los métodos de PB con agentes indirectos son más útiles para determinar la existencia e intensidad de la inflamación bronquial activa (109), reflejan mejor el efecto de la exposición alérgica (110) y el uso de corticosteroides inhalados (111), ya que el resultado de éstos depende de la presencia de células inflamatorias en la vía aérea. Un resultado negativo en la PB con agentes indirectos indica la falta de un componente en la HRB, por ejemplo, un músculo liso que no responde a mediadores endógenos como ocurre en la bronquitis eosinofílica, o un número insuficiente de células inflamatorias en la vía aérea, como es el caso de un paciente tratado con corticosteroide inhalado (112).

Los estímulos indirectos pueden ser físico-químicos o farmacológicos (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Agonistas indirectos

<b>Estímulos físicos o físico-químicos</b>	<b>Estímulos farmacológicos.</b>
Ejercicio	Adenosina (AMP)
Estímulos osmóticos:	Taquicinas:
Aerosoles hipertónicos	Sustancia P
Aerosoles hipotónicos	Neurocinina A
Manitol	
Ventilación voluntaria eucápnica	Bradicinina
	Metabisulfito/dióxido de sulfuro
	Propranolol
	Acetaldehído

El ejercicio y la hiperventilación voluntaria eucápnica producen una pérdida de humedad de la vía aérea, lo que resulta en un medio hiperosmolar que da lugar a la liberación de células inflamatorias.

La inhalación de suero salino hipertónico y manitol son también estímulos hiperosmolares. El monofosfato de adenosina (AMP) desencadena liberación de mediadores por otros mecanismos que se explican a continuación.

#### Adenosina

La adenosina (9- $\beta$ -D-ribofuranosil-6-aminopurina) es un nucleótido derivado de la purina que está implicado en numerosos procesos fisiológicos (control del tono vascular e intestinal, neurotransmisión, etc.) y en procesos inflamatorios (113). La adenosina se genera de la

defosforilación de la adenosina 5'-monofosfato (AMP) por la acción de la 5'-nucleotidasa o por el catabolismo de la 5-adenosinhomocisteína. Las células principales productoras de adenosina se cree que son los mastocitos, neutrófilos, plaquetas y células del epitelio bronquial. La adenosina es capaz de producir broncoconstricción, un aumento de la exudación plasmática y del flujo sanguíneo (edema de mucosa), estimular la quimiotaxis de neutrófilos (114) y la liberación de histamina por mastocitos y basófilos (115,116). Además estimula la secreción de IL-8 a través de la activación de los receptores  $A_{2b}$  de mastocitos (117). Los efectos fisiológicos de la adenosina son consecuencia de la estimulación de receptores específicos:  $A_1$ ,  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$ ,  $A_3$  (118), existentes en mastocitos, neutrófilos, células endoteliales, neuronales y eosinófilos entre otros (**Tabla 7**).

La inhalación de adenosina no tiene efecto detectable sobre el calibre de la vía aérea en sujetos normales, pero ocasiona una limitación al flujo aéreo dependiente de concentración en pacientes con asma alérgico y no alérgico (119). La hipótesis sugerida para explicar porqué la adenosina inhalada genera broncoconstricción en sujetos asmáticos y no en sujetos sanos es que en presencia de concentraciones bajas de adenosina (sujetos sanos) se estimula el receptor de alta afinidad  $A_{2a}$  que activa la adenilciclase y, al aumentar el AMPc, inhibe la degranulación del mastocito. Por el contrario, en sujetos asmáticos, con elevadas concentraciones de adenosina, se estimula el receptor de baja afinidad  $A_{2b}$ , lo que desencadena un aumento de calcio intracelular que activa el mastocito (118).

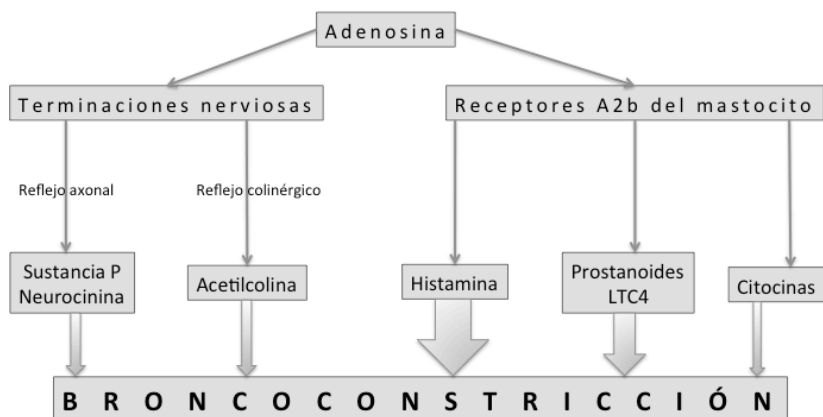
**Tabla 7.** Receptores de adenosina y sus efectos (118)

Receptor	Localización	Efecto
A <sub>1</sub>	Terminaciones nerviosas	Induce actividad del neutrófilo
	Neutrófilos	Actividad ciliar
A <sub>2a</sub>	Mastocito	Aumenta el AMPc a baja
	Neutrófilo	concentración de adenosina
	Células T	
A <sub>2b</sub>	Mastocito	Degranulación de mastocitos
	Células endoteliales,	Aumenta el AMPc a alta
	musculares, nerviosas,	concentración de adenosina
A <sub>3</sub>	neuroglia y fibroblastos	
	Mastocito	Activa fosfolipasa C
	Eosinófilo	Activación de eosinófilos

El mecanismo por el que la adenosina produce broncoespasmo es la liberación de mediadores (histamina, prostaglandinas, leucotrienos y otros) de los mastocitos. La premedicación con agentes estabilizadores del mastocito, como el cromoglicato o el nedocromil, inhibe este efecto en pacientes asmáticos (120–122). Además, el tratamiento previo con antihistamínicos, inhibidores de la ciclo-oxigenasa y de la lipo-oxigenasa y los antagonistas de los receptores de los leucotrienos reducen la respuesta a adenosina en asmáticos (123–126). Los corticosteroides inhalados tienen también un efecto atenuador de la respuesta a adenosina mayor que a la

metacolina (127), probablemente debido a la reducción tanto del número como de la función de los mastocitos en la vía aérea (128).

Los mecanismos neurosensorial, el reflejo axonal y el estímulo colinérgico también juegan un papel ya que se ha demostrado que la administración de bromuro de ipratropio y otros agentes que modulan la respuesta neural, son capaces de inhibir el broncoespasmo causado por adenosina y no por histamina (113,129–131), lo que sugiere que el músculo liso no es estimulado directamente. Además, parece facilitar la liberación de neuropéptidos estimuladores de la contracción por parte de las terminaciones neurosensoriales (**Figura 5**).



**Figura 5.** Mecanismos de broncoconstricción originados por adenosina

#### Provocación bronquial con adenosina

La PB con adenosina se efectúa a partir de una solución de sal disódica de AMP (Sigma Chem, St. Louis, MO, USA) en suero salino 0,9%. El 5'-

monofostato de adenosina (AMP) es mucho más hidrosoluble (concentración máxima 1,08 M) que la adenosina (concentración máxima 25 mM) y, por lo tanto, se prefiere para la PB (132). Las concentraciones recomendadas por la ERS son las que figuran en la **Tabla 8** (86).

Los sistemas de nebulización y protocolos son los mismos que los referidos para la metacolina. El registro de respuesta, la medida e interpretación de los resultados son también superponibles.

**Tabla 8.** Protocolo de provocación bronquial con adenosina

<b>Etap</b>	<b>Concentraci3n</b> <b>(mg/mL)</b>	<b>N3mero de</b> <b>inspiraciones</b>
1	Diluyente	5
2	3,125	5
3	6,25	5
4	12	5
5	25	5
6	50	5
7	100	5
8	200	5
9	400	5

La PB con adenosina es m3s espec3fica que sensible, por lo que es 3til para confirmar el diagn3stico de asma. Las contraindicaciones de la t3cnica son las mismas que las se3aladas para la metacolina. Las precauciones con respecto a los factores que modifican la respuesta son superponibles, a

excepción de los corticosteroides inhalados, que deben ser suprimidos 12 horas antes de la prueba, dado que la respuesta a adenosina es muy sensible a los mismos.

### ***Comparación de la provocación bronquial con agonistas directos e indirectos***

Las diferencias entre PB con agentes directos e indirectos se resume en la **Tabla 9** y apoyan la hipótesis propuesta por Pauwels et al. (89) en 1988, según la cual los estímulos naturales que causan asma actúan por mecanismos indirectos y, por tanto, estos agentes reflejan mejor el estado de la vía aérea.

La respuesta a los agentes directos mide la función del músculo liso bronquial y, en menor grado, el componente variable resultado de la inflamación de la vía aérea. El calibre de la vía aérea es un determinante importante de la respuesta a estímulos directos, se necesita una dosis relativamente baja de agonista para obtener respuesta, no hay limitación de la dosis que se puede administrar y los puntos de corte definen un test muy sensible pero no tan específico. Por lo tanto, los agonistas directos sirven para descartar asma cuando el test es negativo.



**Tabla 9.** Comparación entre la provocación bronquial con agentes directos e indirectos. Modificado de (133)

	<b>Agentes directos</b>	<b>Agentes indirectos</b>
Mecanismo de acción	Receptores muscarínicos de la vía aérea	Liberación de mediadores
Función músculo liso	++++	++
Calibre de la vía aérea	+++	Nulo/mínimo
Inflamación	++	++++
Dosis necesaria	Baja	Alta
Período refractario	+/-	++++
Inhibición por cromoglicato	Nula	++++
Sensibilidad	Alta	Baja
Especificidad	Baja/moderada	Alta
Síntomas	+++	++++
FEV <sub>1</sub>	+++	+/-
Valor diagnóstico	Descartar asma	Confirmar asma

Por el contrario, los test con agonistas indirectos dependen de forma crítica de la presencia de células inflamatorias en la vía aérea. Obviamente se requiere un órgano efector final, que es el músculo liso, pero éste es menos importante. El calibre de la vía aérea es menos determinante en la respuesta a estímulos indirectos. Las dosis de agonistas son mucho más altas con

adenosina (134) o manitol (135), comparadas con las de metacolina, y la dosis es limitada.

Estudios comparativos han mostrado que la PB con estímulos indirectos es altamente específica pero tiene relativamente baja sensibilidad comparado con metacolina, que tiene una elevada especificidad pero baja sensibilidad (136–140). Las PB con agonistas indirectos sirven por tanto para confirmar la enfermedad, y son el test de elección para sujetos con sospecha de asma inducida por esfuerzo.

Al contrario que los test directos, los indirectos son negativos en sujetos con una obstrucción fija al flujo aéreo (141,142). Las PB con agonistas indirectos se correlacionan mejor con la inflamación eosinofílica de la vía aérea (109,142,143) y demuestran un mayor grado de mejoría tras la evitación del alérgeno (144,145) y tratamiento con corticosteroide inhalado (146,147).

## **Medición de la inflamación bronquial**

### ***Óxido nítrico***

El óxido nítrico (NO) es una molécula esencial en la fisiología humana. Ya en 1980 se objetivó que las células endoteliales eran capaces de liberar un factor, denominado factor relajante derivado del endotelio (EDRF), que difundía a la capa muscular produciendo una relajación de la misma. Algunos años más tarde, en 1987, se demostró que ese EDRF era NO. A

partir de ahí se le concedió importancia al NO y otros óxidos de nitrógeno en la regulación de varias funciones en el organismo, como la agregación plaquetaria o la neurotransmisión. Esto culminó con el premio Nobel en Medicina y Fisiología en el año 1998. En 1991 Gustafsson et al. (148) midieron el NO endógeno en el aire exhalado de humanos y otros mamíferos y unos años más tarde se determinó que las concentraciones de NO eran más altas en pacientes con asma (149,150).

El NO puede ser producido por varias células en la vía aérea, como células inflamatorias, células endoteliales y epiteliales. El NO actúa como neurotransmisor de las terminaciones inhibitorias no adrenérgicas no colinérgicas (iNANC). En la vía aérea central y periférica el NO es responsable de la respuesta broncodilatadora (151).

El NO tiene una vida media corta (1-5 seg) debido a su reactividad con la hemoglobina (152). Es una molécula mensajera ubícua que tiene efecto en varias funciones biológicas, tanto a concentraciones bajas (señalizador en la regulación del flujo sanguíneo, reactividad plaquetaria, neurotransmisión NANC) o a elevadas concentraciones como mecanismo defensivo citostático frente a tumores y patógenos (153).

El sistema enzimático responsable de la génesis de NO fue identificado por primera vez en 1990 por Bult et al. (154). Se han descrito tres isoenzimas de la NO sintetasa (NOS): la NOS neuronal constitutiva (nNOS o NOS I), la NOS inducible (iNOS o NOS II), y la NOS endotelial constitutiva (eNOS o NOS III). Las tres isoenzimas son producto de la expresión de diferentes genes

localizados en los cromosomas 12, 17 y 7 respectivamente y tienen unos patrones de expresión característicos específicos de tejidos (155). No obstante, las tres isoenzimas se expresan en la vía aérea (156–158). eNOS (NOS III) se expresa constitutivamente en el epitelio bronquial, en células epiteliales alveolares tipo II y en el epitelio de la mucosa nasal. nNOS (NOS I) se localiza en las terminaciones nerviosas del músculo liso bronquial, donde el NO es el principal mediador de la relajación muscular, y en células endoteliales. La expresión de iNOS (NOS II) se ha identificado en células epiteliales alveolares tipo II, fibroblastos pulmonares, músculo liso bronquial y vasculares, células epiteliales, endoteliales y neutrófilos (159). Las formas constitutivas de la NOS (NOS I y NOS III) son enzimas dependientes de calcio y calmodulina y producen en segundos concentraciones de NO del orden de femto- o picomolar, tras el estímulo por agonistas selectivos (acetilcolina, ADP, bradicinina, histamina o trombina, entre otros). La forma inducible (NOS II) está regulada a nivel pretranslacional y puede ser inducida por citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  (160). La iNOS libera grandes cantidades de NO, del orden nanomolar, varias horas tras la exposición al desencadenante, y que pueden mantenerse de forma sostenida durante horas o días. Además, el NO se puede formar de manera no enzimática a partir de nitritos. En la cavidad oral y la faringe, las bacterias anaerobias facultativas reducen los nitratos a nitritos que posteriormente se reducen y conducen a la formación de NO, lo que puede contribuir a la medición de NO en aire exhalado (161).

### La medición del óxido nítrico en aire exhalado

En el año 1997 la ERS publicó unas recomendaciones sobre la medición del óxido nítrico en aire exhalado (FeNO) (162) y en el año 1999 lo hizo la ATS (163). Ambas normativas son diferentes en cuanto a los flujos respiratorios de medida: la ERS recomienda flujos de 167-250 mL/seg y la ATS flujos de 45-50 mL/seg. Dado que la tasa de flujo influye en la concentración de FeNO medida, ambos resultados no son comparables. Por este motivo en 2005 se publicó una normativa conjunta en la que se recomienda medir el FeNO a un flujo de 50 mL/seg (164).

El registro de NO se puede realizar según dos métodos diferentes: el registro *on line* y el registro *off line*.

El registro *on line* consiste en la medición de FeNO mediante inspiración profunda hasta llegar a capacidad total y posteriormente exhalarlo contra resistencia. La concentración de FeNO se mide directamente del trazador. Esta técnica es muy reproducible (165) y está mejor estandarizada que la técnica *off line*.

El registro *off line* requiere almacenar el aire exhalado en un recipiente paropiado para determinar la concentración de NO posteriormente.

El NO exhalado puede medirse por diferentes técnicas: quimioluminiscencia, mediante sensor electroquímico y mediante espectroscopía láser (166). El método quimioluminiscente fue el primero en ser utilizado (148). Se basa en la reacción entre el NO y el ozono, que conduce a la formación de NO<sub>2</sub> en un estado excitado. Cuando la molécula

vuelve a su estado basal, emite un fotón. Por lo tanto, el número de fotones detectados es proporcional a la cantidad de NO en aire exhalado NO (167). Este método es muy sensible y permite detectar cantidades tan bajas como 1 ppb. Sin embargo, estos analizadores son complejos y de grandes dimensiones, lo que ha hecho posible el desarrollo de aparatos portátiles basados en sensores electroquímicos que tienen a ventaja de ser compactos y portátiles. Se ha demostrado una buena correlación en la medición de FeNO con ambos métodos (168–171) y su uso está actualmente muy extendido. La determinación de FeNO también es posible mediante láser, aunque su uso se ha limitado a investigación (172) y no a la clínica habitual. Actualmente se dispone de un dispositivo portátil para la medición de FeNO (NIOX-MINO® Aerocrine, Solna, Suecia), que analiza el NO mediante un sensor electroquímico (173). Las principales diferencias con la otra técnica es que el paciente realiza una inspiración profunda desde el interior del equipo a través de un filtro y hasta capacidad pulmonar total (en el sensor de quimioluminiscencia se realiza desde el aire ambiente). A continuación se realiza una espiración al interior del equipo a un flujo mantenido de 50 ml/s, controlado por un sensor lumínico y acústico para facilitar y asegurar el flujo. Este procedimiento requiere una única determinación y el resultado se expresa en la pantalla digital del equipo. Tiene un error inferior al 3% en determinaciones de menos de 30 ppb e inferior al 10% en valores mayores de 30 ppb, y un margen de lectura entre 5 y 300 ppb y no necesita calibración.

### Factores que afectan a la medición del óxido nítrico en aire exhalado

Los valores que se obtienen en la medida de eNO están influenciados por una variedad de factores externos, por lo tanto la estandarización es imprescindible.

El paciente debe inspirar hasta capacidad pulmonar total y comenzar una exhalación inmediatamente sin contener el aire, dentro del analizador. La exhalación debe realizarse a un flujo de 50 mL/seg y durar 6-10 seg (164). Actualmente los analizadores portátiles de FeNO disponen de un filtro que permite al paciente inhalar aire libre de NO, lo que facilita la maniobra ya que no es necesaria una calibración previa del analizador con diferentes concentraciones de NO. No obstante existen algunos factores técnicos que pueden alterar la medición de FeNO (**Tabla 10**).

Además de los factores técnicos, existen factores relacionados con el paciente que también pueden afectar a la determinación de NO.

Aunque los resultados de las investigaciones son contradictorios en algunos casos, en general se acepta que las mujeres tienen unos niveles más bajos de FeNO, bien sea porque su producción endógena es menor por niveles más bajos de nitratos en plasma (174), o porque la superficie de la vía aérea es menor (175).

**Tabla 10.** Factores técnicos que afectan a la medición del óxido nítrico en aire exhalado

Factor	Efecto
<b>Maniobra inspiratoria</b>	Inhalar hasta capacidad residual funcional en vez de hasta capacidad pulmonar total resulta en valores más bajos de eNO (176)
<b>Contener el aire</b>	Una maniobra en la que se contiene el aire antes de la exhalación resulta en un pico de eNO, probablemente debido al acúmulo de NO en la orofaringe (177), por este motivo la exhalación debe comenzar inmediatamente tras la inhalación (164)
<b>Flujo de exhalación</b>	El FeNO disminuye a medida que aumenta el flujo de exhalación (167,176,178). Por este motivo se debe exhalar a un flujo constante, que actualmente se recomienda que sea 50 mL/seg (164)
<b>Tiempo de exhalación</b>	Un tiempo de exhalación corto supone valores más bajos de FeNO. Se recomiendan tiempos de exhalación de 10 seg para adultos y de 6 seg para niños (179)
<b>Presión en la cavidad oral</b>	Se recomienda que se realice la exhalación contra presión de al menos 5 cmH2O para asegurar un cierre del velo del paladar y así evitar la contaminación de NO proveniente de la cavidad nasal (164)
<b>NO ambiente</b>	La concentración de NO en aire ambiente puede influir en la determinación de FeNO, por este motivo se recomienda que se use un filtro depurador de NO (164) que ha demostrado ser eficaz (180)



La altura es la variable independiente que más se ha asociado a los niveles de FeNO. Así, en niños, un incremento de 60 cms en altura se ha asociado con unos niveles de FeNO dos veces superiores (181), probablemente en relación al tamaño de la vía aérea del paciente. Igualmente la edad en sí misma no tiene efecto en la medición de FeNO, salvo en el caso de los niños, que se asocia con mayor altura y, por tanto, mayores niveles de FeNO (181). La ingesta de alimentos ricos en nitratos también influye en un incremento de FeNO de hasta el 50% (161,182,183). Por este motivo es recomendable indicar a los pacientes que eviten la ingesta de alimentos ricos en nitratos en el día de la prueba.

Otro factor que se asocia con unos niveles mayores de FeNO es la sensibilización alérgica IgE-mediada (184) en una proporción que varía entre el 15-60%. La exposición reciente a alérgenos en pacientes asmáticos o en pacientes con rinitis alérgica puede incrementar los valores de FeNO en torno a un 50% (185,186). Del mismo modo, las infecciones por rinovirus se ha puesto de manifiesto que incrementan los valores de FeNO hasta en un 500% en sujetos sanos (187) y , en menor medida, en sujetos asmáticos (188,189).

Este efecto puede persistir hasta cinco semanas, por lo que se debe tener en cuenta a la hora de medir el FeNO.

Por el contrario hay factores que disminuyen la determinación de FeNO. La PBI con agentes directos o indirectos se ha relacionado con menores niveles

de FeNO, sugiriendo que el calibre de la vía aérea *per se* afecta a la medición de NO (190–192). También el hábito tabáquico se ha correlacionado con unos valores de FeNO 40-60% más bajos que en sujetos no fumadores, y esta disminución parece ser proporcional a la magnitud del consumo (193–195).

Se ha evaluado la influencia de otros factores, con resultados controvertidos. Así, con el ejercicio físico y las maniobras espirométricas se ha obtenido resultados contradictorios (196–198), por lo que se recomienda no practicar ejercicio físico una hora antes de la determinación de FeNO, y hacerlo previo a la espirometría (164).

Del mismo modo, algunos fármacos para el tratamiento del asma tienen efecto sobre la medición del FeNO. Un resumen de los mismos y su posible mecanismo de acción se muestran en la **Tabla 11**.

#### Utilidad de la determinación de óxido nítrico en aire exhalado

El eNO se ha correlacionado con la HRB a MCh en pacientes con asma (199,200) y con la variabilidad del pico flujo (201). Además, y sobre todo, se ha demostrado su correlación con la inflamación eosinofílica en pacientes asmáticos con diferentes grados de gravedad del asma (201–208). Se ha objetivado una correlación entre los niveles de FeNO y el número de eosinófilos en el lavado broncoalveolar (206) y con el número de eosinófilos en esputo inducido ( $r=0,48-0,62$ ) (200,208,209). Varios autores

(208,210,211) han establecido puntos de corte de FeNO en relación con un número de eosinófilos en esputo que varía entre el 1-3%. Así, Berry et al. (208) establecen un punto de corte de FeNO=36 ppb con una sensibilidad del 78% y especificidad del 72% para un número de eosinófilos en esputo >3%. Shaw et al. (210) por su parte sugieren que un FeNO <26 ppb tiene un VPN de 85% para un número de eosinófilos en esputo <3% y más recientemente Porsbjerg et al. (211) ofrecen un punto de corte similar (FeNO <27 ppb) que se asocia con una baja probabilidad de encontrar eosinófilos en esputo por encima del 1%. Por este motivo en eNO se considera un biomarcador no invasivo de la inflamación eosinofílica en el asma.

Además, varios trabajos (212-214) han demostrado unos valores predictivos robustos (para FeNO >25 ppb) en el diagnóstico de asma, siendo los VPP mayores que para el pico flujo y la espirometría (212) y similares a los de la provocación bronquial (214).

El FeNO se ha usado para monitorizar las exacerbaciones de asma, tanto las espontáneas (215), como las inducidas por una reducción de las dosis de corticosteroides, así como para valorar el efecto del tratamiento antiinflamatorio (216,217).

Actualmente las recomendaciones en cuanto a la determinación de FeNO propuestas por la ATS son las siguientes (87):

- En el diagnóstico de la inflamación eosinofílica de la vía aérea (recomendación fuerte, moderada calidad de la evidencia)

**Tabla 11.** Efecto de la medicación anti-inflamatoria para el asma sobre la medición de óxido nítrico

Fármaco	Efecto	Mecanismo de acción
Corticosteroides	Disminución marcada	Bloquea GATA-3 → Menor liberación de IL-4/IL-13 → Menor activación de STAT-6 en epitelio → Menor expresión de iNOS en epitelio.
LTRA	Disminución leve	Reduce eosinofilia → Posible menor liberación de IL-13?
Anti-IgE	Disminución	Bloqueo Th2/activación mastocitos → Menor liberación de IL-4/IL-13
Cromonas	Sin efecto	
Metilxantinas	Sin efecto	
Anti-IL-4/IL-13	Disminución	Reduce la activación de STAT-6 en epitelio
Anti IL-5	Sin efecto	
Anti-TNF- $\alpha$	Sin efecto	

- Para determinar la probabilidad de respuesta a corticosteroides en pacientes con síntomas respiratorios crónicos posiblemente debidos a inflamación de la vía aérea (recomendación fuerte, baja calidad de la evidencia)
- Se sugiere el uso de FeNO para apoyar el diagnóstico de asma en situaciones en que es necesara una evidencia objetiva (recomendación débil, moderada calidad de la evidencia)

- Se sugiere el uso de puntos de corte, más que valores de referencia a la hora de interpretar los resultados (recomendación débil, baja calidad de la evidencia)
- Tener en cuenta la edad en menores de 12 años, como factor que puede afectar a la medición de FeNO (recomendación fuerte, alta calidad de la evidencia)
- Valores de FeNO <25 ppb indican una baja probabilidad de inflamación eosinofílica y de respuesta a corticosteroides (recomendación fuerte, moderada calidad de la evidencia)
- Valores de FeNO >50 ppb indican una elevada probabilidad de inflamación eosinofílica y de respuesta a corticosteroides en pacientes sintomáticos (recomendación fuerte, moderada calidad de la evidencia)
- Valores de FeNO entre 25-50 ppb deben ser interpretados con precaución y siempre en el contexto clínico (recomendación fuerte, baja calidad de la evidencia)
- Tener en cuenta la exposición a alérgenos como un factor asociado a valores de FeNO persistentemente elevados (recomendación fuerte, baja calidad de la evidencia)
- Recomienda el uso de FeNO para el seguimiento de los pacientes con asma (recomendación fuerte, baja calidad de la evidencia)

- Considerar significativo el incremento de FeNO en 10 ppb para valores < 50 ppb y del 20% para valores >50 ppb (recomendación débil, baja calidad de la evidencia)
- Considerar significativo el descenso de FeNO en 10 ppb para valores < 50 ppb y del 20% para valores >50 ppb (recomendación débil, baja calidad de la evidencia)

## ***Diagnóstico etiológico***

### **La provocación bronquial específica**

La prueba de provocación bronquial específica (PBE) requiere la administración intermitente de dosis crecientes de aerosol del alérgeno sospechoso acompañado de la determinación de test de función pulmonar de forma repetida para valorar la concentración de agente que es capaz de ocasionar una caída del FEV<sub>1</sub> del 20%, lo que es considerado una respuesta positiva.

Hasta 1970 la PBE se utilizaba fundamentalmente con fines diagnósticos, sin embargo progresivamente su uso se ha ido reduciendo. Se ha demostrado que existe una correlación entre los test cutáneos, la IgE específica y los resultados de la PBE a un alérgeno específico, por lo que la PBE no es necesaria en la mayoría de los casos de asma. Sin embargo, en los

casos en que la historia clínica y las pruebas cutáneas no son concluyentes la PBE es útil, así como en los casos de asma ocupacional y en la identificación de nuevos alérgenos y su relevancia clínica (218–220).

Las contraindicaciones para la prueba figuran en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Contraindicaciones para la provocación bronquial específica (218)

Absolutas	Obstrucción bronquial con $FEV_1 > 70\%$
	Accidente cerebrovascular o infarto miocárdico reciente
	Hipertensión arterial no controlada
	Aneurisma de aorta
	Epilepsia mal controlada
	Tratamiento con beta-bloqueantes
	Incapacidad para las maniobras espirométricas (defectos mandibulares, cirugía oral, desprendimiento de retina...)
Relativas	Embarazo o lactancia
	Labilidad de la vía aérea

***Técnica de provocación bronquial específica***

Para la realización de la PBE se deben utilizar extractos que cumplan unos criterios de calidad y estabilidad y estar estandarizados en unidades biológicas. Antes de iniciar la administración del extracto alérgico se debe

comprobar que el paciente cumple los requerimientos previos (**Tabla 13**) y se ha suspendido la medicación que puede interferir en la respuesta bronquial (**Tabla 14**). Se debe hacer una espirometría basal y posteriormente una inhalación del diluyente para excluir hiperreactividad bronquial inespecífica. A continuación se lleva a cabo la PBE.

**Tabla 13.** Requerimientos para la práctica de la provocación bronquial específica (218)

- 
- Estable sin medicación y  $FEV_1 \geq 70\%$  del predicho al inicio de la prueba
  - Que no haya sufrido una reagudización grave en los últimos seis meses
  - Que no haya tenido infección respiratoria en las seis semanas anteriores
  - Que no haya sido vacunado con virus vivos atenuados en las seis semanas previas
- 

La inhalación del alérgeno en un paciente sensibilizado puede desencadenar reacciones asmáticas inmediatas, tardías o duales. La reacción inmediata es debida a el efecto de mediadores, como histamina, PG o LT y comienza minutos tras la provocación, llegando al máximo en torno a los 15-20 minutos y se resuelve habitualmente en 1-2 horas. La reacción tardía se caracteriza por un infiltrado de eosinófilos, linfocitos y basófilos, que habitualmente comienza tras 3-4 horas de la finalización de la PBE y llega a



su máximo en torno a 7-12 horas, persistiendo en algunos casos un FEV<sub>1</sub> disminuido hasta 24 horas después.

**Tabla 14.** Medicación que afecta a la respuesta bronquial e intervalo de suspensión

Corticosteroides inhalados	1-2 semanas
Teofilinas	
Beta2-adrenérgicos orales	48 horas
Antihistamínicos (salvo astemizol, 6 semanas)	
Beta-agonistas de acción corta	12 horas
Beta-agonistas de acción larga	24 horas
Anticolinérgicos	
Cromoglicato y nedocromil sódico	12-24 horas

Los métodos de inhalación más habituales son:

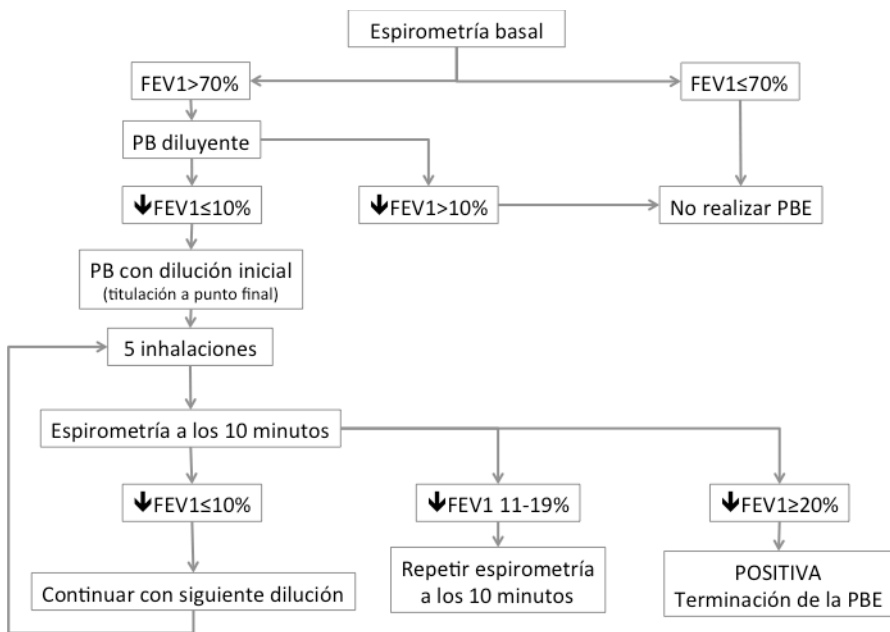
- **Sistema de generación continua de aerosol** que se realiza a volumen corriente. El nebulizador está conectado a una fuente de aire comprimido que genera un *output* constante de 0.13 mL/min. La solución se inhala durante 60 segundos. La función pulmonar se mide inmediatamente tras la inhalación y a los 15 minutos. El intervalo entre las distintas concentraciones debe ser de al menos

20 minutos para evitar broncoconstricción grave. Cuando se alcanza una caída del FEV<sub>1</sub> entre el 15-20% desde el valor basal, se detiene la prueba. Habitualmente este sistema se inicia con concentraciones de 80 UB/mL y se quintuplican en cada paso. También se puede iniciar con una concentración que se calcula basado en la titulación a punto final de dicha solución en *prick*. En este caso la nebulización se inhala durante 2 minutos y la dosis se dobla cada 10-20 minutos.

- **Método dosimétrico.** Con este método se administra una dosis prefijada puesto que el dosímetro dispone de una válvula solenoide que administra un flujo y duración predeterminada. La concentración con la que se debe iniciar la prueba se calcula mediante la prueba de *prick test* con diluciones seriadas (titulación a punto final), comenzando la PBE con la dilución anterior a la que genera un *prick test* positivo ( $\geq 3$  mm). El protocolo de PBE se muestra en la **Figura 6**.

La prueba se considera positiva cuando se alcanza una caída del FEV<sub>1</sub>  $\geq 20\%$  del basal, tras lo cual se administra medicación broncodilatadora. En el caso de que se llegue a la concentración final y no se haya obtenido una caída del FEV<sub>1</sub>  $\geq 20\%$ , la prueba se considera negativa. En cualquiera de los dos casos, se monitorizará la función pulmonar al menos dos horas tras la terminación

de la prueba en el ámbito hospitalario y se hará seguimiento domiciliario en las 24 horas siguientes mediante registro de *peak flow*.



**Figura 6.** Esquema de realización de provocación bronquial específica

### ***Monitorización de la respuesta bronquial***

La monitorización de la respuesta bronquial tras la PBE se efectúa clásicamente mediante la medición del FEV<sub>1</sub> y el PEF. El FEV<sub>1</sub> es el parámetro más fiable y reproducible como indicador de obstrucción bronquial y se considera el parámetro de referencia. Durante la prueba de la PBE y hasta al menos dos horas tras la finalización, se medirá en el laboratorio de función pulmonar. No obstante, durante las 24 horas

siguientes, en las que se debe supervisar la respuesta, la determinación de PEF es un método asequible para valorar la respuesta bronquial, aunque éste dependa más del esfuerzo y refleje más los cambios en la vía aérea proximal que en la distal. Se considerará positiva la respuesta si hay una reducción del  $FEV_1 \geq 20\%$  en cualquier momento del seguimiento o de  $\geq 25\%$  del valor basal de PEF. No obstante se deben tener en cuenta respuestas del  $FEV_1$  del 15% en el caso de que se acompañen de síntomas de rinoconjuntivitis o tos.

Varios artículos han demostrado un aumento de eosinófilos en la vía aérea tras la realización de una PBE (221–223), y la presencia de los mismos aumenta la especificidad de la prueba.

Puesto que la medición de FeNO es un marcador indirecto de inflamación bronquial, éste se ha utilizado en algunos casos, aunque con resultados inconsistentes, para la monitorización de la PBE (224–231).

## **OBJETIVO**



El objetivo de la presente tesis es analizar la importancia del componente inflamatorio bronquial en el asma y el valor que tiene su determinación como parte del diagnóstico.

En el diagnóstico del asma clásicamente se ha tenido en cuenta, sobre todo, la hiperrespuesta bronquial. Hasta la fecha, este es el principal componente que se valora y su medición se considera una prueba de referencia en el diagnóstico del asma según las guías clínicas (1,2).

Sin embargo el componente inflamatorio es una parte muy importante en la patogenia del asma. Actualmente disponemos de diferentes formas de determinar la inflamación bronquial de forma poco invasiva. Por este motivo, en esta tesis se plantea el uso de los marcadores de inflamación bronquial como posibles herramientas diagnósticas en el asma.

Para ello se estudiará la hiperrespuesta bronquial frente a agentes indirectos de provocación bronquial inespecífica (adenosina), que son un mejor reflejo de la inflamación de la vía aérea, en pacientes con sospecha de asma, y se comparará el resultado con el obtenido en la prueba de provocación con metacolina, que se considera la prueba de referencia en el diagnóstico.

Igualmente se valorará la determinación de óxido nítrico en aire exhalado (FeNO), marcador indirecto no invasivo de la inflamación eosinofílica de la vía aérea, tanto en el diagnóstico de asma en pacientes con síntomas sugestivos, como en la monitorización de la respuesta bronquial tras la provocación bronquial específica con alérgeno.

En ambos casos se busca el rendimiento diagnóstico de dichas pruebas para el diagnóstico de asma.



## **PACIENTES Y MÉTODOS**



En todos los trabajos se llevó a cabo el protocolo de diagnóstico habitual que incluye realización de pruebas cutáneas con una batería de neumolérgenos habituales, espirometría basal y test de broncodilatador, siguiendo los criterios de la ATS (232). Los test de provocación bronquial específica (PBE) e inespecífica (PBI) se llevaron a cabo siguiendo el método dosimétrico de cinco inhalaciones (99,233). El óxido nítrico en aire exhalado (FeNO) se determinó mediante reacción electroquímica utilizando un analizador portátil de NO (NIOX MINO™, Aerocrine, Solna, Suecia) (169). El primer capítulo de esta tesis es un estudio prospectivo randomizado, simple ciego, cruzado, en el que se incluyeron cincuenta y siete pacientes con síntomas sugestivos de asma y una espirometría normal con test de broncodilatación negativo. Se les sometió en orden aleatorio a provocación bronquial inespecífica con metacolina y adenosina mediante método dosimétrico, separadas al menos 3 días. Se compararon los resultados de ambas provocaciones.

El segundo capítulo es un estudio prospectivo en el que se incluyeron 114 pacientes con síntomas sugestivos de asma y una espirometría normal con test de broncodilatación negativo, a los que se realizó PBI con metacolina y determinación de FeNO. Se calculó la rentabilidad diagnóstica del FeNO y el punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de asma.

El último capítulo es un estudio prospectivo en el que se incluyeron treinta y cuatro pacientes con asma que estaban sensibilizados a aeroalérgenos o

alérgenos ocupacionales de alto peso molecular a los que se realizó PBE. Se determinó el FeNO previo a la realización de la provocación con alérgeno. El seguimiento de la respuesta a la PBE se hizo mediante determinación de flujo expiratorio máximo y espirometría, así como determinación de FeNO a las 24 horas de finalizada la provocación.

## RESULTADOS



Los resultados del primer trabajo incluido en esta tesis muestran una elevada correlación entre la provocación bronquial con metacolina (agonista directo) y la adenosina (agonista indirecto). De los 54 pacientes que se estudiaron, la provocación bronquial inespecífica con metacolina fue positiva en 24 de ellos y con adenosina en 27. La concordancia de los resultados de ambas pruebas fue del 94,4% (índice Kappa 0,889). La provocación bronquial con adenosina mostró una sensibilidad del 100%, especificidad del 90%, valor predictivo positivo del 88,9% y valor predictivo negativo del 100% para el diagnóstico de asma.

En el segundo trabajo se obtuvieron unos valores de óxido nítrico en aire exhalado (FeNO) significativamente más altos en la población asmática diagnosticada mediante test de metacolina (58 ppb, IQR: 36-112 vs 30 ppb, IQR: 21-42,75;  $p<0,001$ ). Se estableció un punto de corte de FeNO de 40 ppb con una sensibilidad de 74,3%, especificidad de 72,5%, valor predictivo positivo de 54,2% y valor predictivo negativo de 86,6%.

En el tercer trabajo se evidenció un incremento de FeNO con respecto al basal de +14 ppb en los pacientes con un resultado positivo en la provocación bronquial específica con alérgeno (PBE), que no se objetivó en los pacientes con resultado negativo (- 1 ppb), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p<0,001$ ).

Clasificando los pacientes con PBE positiva según el tipo de respuesta, no hubo diferencias en el incremento de FeNO ( $p=0,83$ ).

Este incremento de FeNO observado, no dependió tampoco de los valores de FeNO previos a la PBE, sino del resultado de la misma. Se estableció un punto de corte para el incremento porcentual de los niveles de FeNO tras la PBE del 12% que mejor diferenció el resultado de la PBE (positivo vs. negativo). Este punto de corte mostró una sensibilidad del 80,95%, especificidad del 92,31%, valor predictivo positivo de 94,44% y valor predictivo negativo de 72%.



## **CAPÍTULO 1**



***COMPARISON OF METHACHOLINE AND ADENOSINE  
INHALATION CHALLENGE IN PATIENTS WITH  
SUSPECTED ASTHMA***

**(COMPARACIÓN DE LA PROVOCACIÓN INHALATORIA CON ADENOSINA  
Y METACOLINA EN PACIENTES CON SOSPECHA DE ASMA)**

**Autores:**

María Pedrosa, Pilar Barranco, Magdalena Caminoa, María Dolores Botello,  
Santiago Quirce.

**Journal of Asthma 2009; 46: 773-776.**

**FI: 1,848**

**ISSN: 0277-0903**

**DOI: 10.1080/02770900903171424**

**PMID: 19863279**



## ABSTRACT

**Objective:** Bronchial hyperresponsiveness is usually measured by bronchial challenge with direct (e.g. methacholine) and indirect (e.g. adenosine) agonists. A prospective, randomized, crossover, single-blind study was performed to compare both methods in the first diagnosis of asthma.

**Patients and methods:** Fifty-seven patients, in which asthma was suspected, were selected (21 male, 36 female). Fifty-four underwent both challenges following the five-breath dosimeter protocol. PC<sub>20</sub> was calculated according to ATS guidelines. Data of symptoms developed during the challenge, PC<sub>20</sub> methacholine and adenosine, and FEV<sub>1</sub> improvement after bronchodilator therapy were recorded.

**Results:** Symptoms at consultation were consistent with asthma in 68.4% patients, asthma and rhinitis in 29.8% and exercise-induced asthma in 1.8%. Atopy was reported in 93%; 49.1% had family history of atopy and 26.3% of asthma.

The most frequent symptoms developed during the challenge were cough (40.4% with adenosine and 20.4% with methacholine) and wheezing (26.3% and 7.4% respectively), statistically significant differences.

Bronchial challenge with MCh resulted positive in 44.4% of the patients and positive with AMP in 50%. Every patient with negative result to adenosine, was also negative to methacholine. In 94.4% subjects the result of both

challenges was concordant (kappa index=0.889). PC<sub>20</sub> in both challenges showed poor linear correlation (Pearson  $r=0.43$ ,  $p<0.05$ ).

Positivity of both challenges was only associated with having a positive skin prick test to danders ( $p=0.001$ ).

Percentage of improvement after bronchodilator was 34.9% (SD12.2%) with adenosine challenge and 33.9% (SD17.9%) with methacholine (differences non statistically significant).

**Conclusions:** Concordance in the result of both techniques is very high. Cough and wheezing are more frequent with adenosine, though not severe. PC<sub>20</sub> with both techniques shows poor linear correlation.

**Key words:** Adenosine, asthma, bronchial challenge, bronchial hyperresponsiveness, methacholine, PC<sub>20</sub>.

## INTRODUCTION

Reversible airway obstruction and airway hyperresponsiveness (AHR) are determinant features in asthma<sup>1,2</sup>. The pathological features that underlie AHR are both bronchial inflammation and airway remodelling. AHR can be measured by bronchial challenge tests with either direct or indirect stimuli<sup>1,2</sup>. Methacholine (MCh) acts directly at bronchial smooth muscle muscarinic receptors causing contraction of airway smooth muscle cells, while adenosine monophosphate (AMP) acts indirectly via activation of A1b receptors on the mast cell surface, leading to degranulation of primed mast cells and the release of pro-inflammatory mediators such as histamine and leukotrienes<sup>3</sup>. MCh challenge is considered the gold standard for establishing the diagnosis of asthma when spirometry and broncodilatador testing are within normal limits<sup>1,2</sup>. Although bronchial challenge tests with both agents have been compared in patients previously diagnosed with asthma<sup>4</sup>, to the best of our knowledge they have never been compared with in patients with suspected asthma with the aim of diagnosing asthma for the first time.

## METHODS

A randomized, single blind, cross-over study was carried out in the Allergy outpatient clinic at University Hospital La Paz (Madrid, Spain) between October 2007 and April 2008.

### *Patients*

Male and female patients were consecutively recruited among those reporting perennial symptoms consistent with asthma (shortness of breath, wheezing and/or cough), regardless their atopic status, and who showed normal spirometric parameters and a negative bronchodilator test. Participants aged 14 years or older were enrolled after written informed consent was obtained (in patients aged less than 18 years written informed consent was obtained from their parents). Exclusion criteria were those previously described for bronchial challenge test<sup>1,2</sup>.

A definitive diagnosis of asthma was made according to published asthma guidelines<sup>1,2</sup> by demonstration of airflow limitation (positive bronchodilator test) and for patients with symptoms of asthma but a normal lung function, by means of a positive MCh challenge. The bronchial challenge was considered positive when a decrease in FEV<sub>1</sub> from baseline of 20% or higher was obtained after inhalation of the pharmacologic agonist.



### ***Skin prick tests***

Skin tests were performed in every patient using the prick method<sup>5</sup>. Common environmental allergen, including house dust mites, grass and tree pollens, moulds (*Alternaria*, *Cladosporium* and *Penicillium*) and animal dander (cat and dog) were tested, as well as histamine (1mg/mL) and physiologic saline solution (0.9%) (ALK-Abelló, Madrid, Spain). Atopy was defined as at least one skin prick test with a wheal diameter of 3 mm or greater than the negative control<sup>5</sup>.

### ***Spirometry***

Spirometry was performed using a Spira Analyzer ST-75 spirometer (Fukuda Sangyo, Nagareyama, Japan) according to the American Thoracic Society (ATS) criteria<sup>6</sup>. The spirometer was calibrated daily with a 3L precision syringe (Vitalograph Ltd, Buckingham, England). FEV<sub>1</sub>, forced vital capacity (FVC) and FEV<sub>1</sub>/FVC were measured prior to the bronchial challenges and then on successive time points according to the challenge protocol. All challenges were performed in the morning and medication withdrawal requirements were ensured.

### ***Bronchial inhalation challenges***

Patients were asked to stop the medication before the challenge as stated previously<sup>1,2</sup>. Both challenges (MCh and AMP) were carried out on two separate occasions at least three days apart.

The bronchial challenges (MCh and AMP) were performed using Spira nebuliser and an electronic dosimeter (Spira Elektro, Respiratory Care Center, Hameelinn, Finland) with an output of 0.45 mL and a nebulisation time of 0.6 sec<sup>7,8</sup>.

MCh inhalation challenge was performed with the five-breath dosimeter method<sup>2</sup> with a dosing schedule of MCh (Provocholine®; Metapharm, Geneva, Switzerland) concentrations of 0.0625, 0.25, 1, 4 and 16 mg/mL. AMP inhalation challenge was also performed following the five-breath dosimeter protocol. Sodium salt of AMP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was diluted in saline solution (0.9% sodium chloride) and stored at 4°C. The dosing schedule was 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 mg/mL<sup>1</sup>. Positivity of the challenge was established when a decrease in FEV<sub>1</sub> of 20% or greater from the lowest post-saline value was achieved. Data are presented as provocative concentration causing a decrease of 20% in FEV<sub>1</sub> (PC<sub>20</sub>)<sup>1,2</sup>. PC<sub>20</sub> was calculated using an algebraic formula<sup>9</sup>.

During both challenges, data on undesired symptoms experienced by the patients after each dose were recorded. Physical examination after each dose and at the end of the challenge was also performed.

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was performed with the SPSS v 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data are presented as mean (SD) and 95% confidence interval (CI).

Chi-square test was used to compare the differences in the results between both positive and negative groups. Data of PC<sub>20</sub> were log transformed to normalize their distribution before analysis. Correlations of the PC<sub>20</sub> MCh and PC<sub>20</sub> AMP were calculated using the Pearson's correlation coefficient. The percent agreement and Kappa statistic for agreement was calculated for the results (positive or negative) of both challenges. P-value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Chi-square test was applied to analyze the possible correlation between positivity to AMP bronchoprovocation challenge and the other different variables analyzed (sex, smoking habit, symptoms prior to the challenge, atopy, positive SPT, first degree family history of asthma and/or atopy). Student's *t* test for equality of means was used to detect differences between mean age in both AMP positive and negative challenge groups.

## RESULTS

Fifty-four patients of the 57 initially recruited were finally included in the study. Three patients did not complete both challenges as they voluntarily retired their consent. Clinical, demographic and functional data were recorded as shown in Table I.

**Table I.** Clinical, demographic and functional characteristic of patients

Number of patients	57
Age (in years)	32 (13)
Gender	
Male	21
Female	36
Smoking habit	
Yes	12
No	37
Symptoms	
Asthma	17
Asthma and rhinitis	39
Exercise induced asthma	1
Atopy ( $\geq 2$ positive SPT)	53
SPT	
Pollen	45
Mites	18
Moulds	11
Danders	30
Family history of asthma	28
Family history of atopy	15
FEV <sub>1</sub> (L, mean $\pm$ SD)	3.48 $\pm$ 0.89
FEV <sub>1</sub> % predicted (mean $\pm$ SD)	105.8 $\pm$ 17.2

SPT: skin prick test; FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in first second

**Challenge results**

Bronchial challenge with MCh resulted positive in 44.4% of the patients and bronchial challenge with AMP was positive in 50% (Table II). In 94.4% of the cases there was an agreement in the result of both challenge tests. The Kappa statistic for agreement was 0.889.

**Table II.** Bronchial responsiveness for both AMP and MCh challenges

	AMP +	AMP -	Total
MCh +	24 (44.4%)	0 (0%)	24 (44.4%)
MCh -	3 (5.6%)	27 (50%)	30 (55.6%)
Total	27 (50%)	27 (50%)	54 (100%)

AMP: adenosine monophosphate; MCh: methacholine; +: positive; -: negative.

The median PC<sub>20</sub> in AMP challenge was 19.57 mg/mL (SD 9.21 mg/mL) whereas in MCh challenge the median PC<sub>20</sub> was 3.32 mg/mL (SD 0.94 mg/mL). Pearson correlation coefficient for PC<sub>20</sub> results with both agents was  $r=0.53$  ( $p<0.05$ ), showing a moderate linear correlation.

Considering the presence of both symptoms consistent with asthma and a positive MCh challenge as the gold standard for establishing a definitive diagnosis of asthma, the diagnostic value of adenosine bronchoprovocation was calculated (Table III).

**Table III.** Diagnostic values of AMP challenge

Sensitivity	100 %
Specificity	90 %
Positive predictive value	88.9 %
Negative predictive value	100 %
Efficiency	94.4 %

***Symptoms experienced during the challenge***

Clinical data on symptoms developed during the bronchoprovocation challenge with both MCh and AMP were registered, as summarized in Table IV. There were no statistically significant differences in symptoms presented during both challenges, except for cough and wheezing, which developed with a significantly higher frequency during the AMP challenge ( $p=0.013$  and  $0.006$  respectively).

***Recovery after a positive challenge***

The percentage of recovery of  $FEV_1$  after bronchodilator was also calculated. In the AMP challenge the mean percentage of recovery was 34.94% (SD 12.24%) and in the MCh challenge was 33.89% (SD 17.86%). The differences were not statistically significant.

**Table IV.** Symptoms during bronchoprovocation challenge

Symptoms	AMP (no. of patients)	MCh (no. of patients)	p
None	27 (47.4%)	36 (63%)	N.S.
Dyspnea	6 (10.5%)	3 (5.6%)	N.S.
Thoracic oppression	2 (3.5%)	7 (13%)	N.S.
Cough	23 (40.4%)	12 (20.4%)	0.013
Wheezing	15 (26.3%)	4 (7.4%)	0.006
Extra pulmonary	1 (1.8%)	3 (5.6%)	N.S.

***Relationship between positive bronchial challenge and variables before the challenge***

Non-statistically significant differences were found between patients with a positive or negative MCh or AMP challenges for the following variables: sex, smoking habit, symptoms before the challenge, atopy, positive SPT, family history of asthma and/or atopy. The only significant difference was the frequency of positive skin prick test to animal dander, which was higher in patients with a positive bronchial challenge ( $p=0.001$ ).

## DISCUSSION

The results of bronchial challenges with AMP agreed with those of MCh in 94.4% of the cases, indicating that AMP is a useful tool for diagnosing asthma. Similar results on kappa index between AMP and MCh inhalation challenges have been previously reported by Ribeiro et al <sup>10</sup>. Only in three cases, AMP was positive but MCh negative. In one of them PC<sub>20</sub> was high (236.47 mg/mL) suggesting that this discordance could be due to the cut-off point for considering the test as positive. The other two cases showed PC<sub>20</sub> values in the medium range, which may be explained because AMP is more related to airway inflammation<sup>11</sup> whereas MCh is more related to functional parameters of bronchial hyperresponsiveness (BHR). These patients might have certain acute inflammatory changes in the airways but not longstanding sequelae of the inflammatory process leading to BHR to MCh<sup>11</sup>.

AMP is a good tool to diagnose asthma, as it has both high positive and negative predictive values. Nevertheless, it does not offer advantages over MCh for asthma diagnosis in clinical practice, as the protocol is longer and undesirable symptoms are more frequent. However, adenosine challenge can be used in cases where MCh is not available or in cases in which assessment of an indirect measure of airway inflammation is desirable. One point of uncertainty is whether the patients with symptoms consistent with asthma, a positive AMP challenge and a negative MCh challenge do really have asthma or whether this situation could be a pre-asthma stage. It may



also reflect a specific asthma phenotype, and this should be clarified in further studies.

Although the qualitative result (positive vs negative) can be comparable for both techniques as they are highly concordant (kappa index 0.889), the quantitative result by means of PC<sub>20</sub> values shows only a moderate linear correlation. This finding is very likely reflecting that both agents act through different pathways.

AMP has also shown to be a safe tool, though wheezing and cough are more frequent than with MCh, as previously reported by Marks et al.<sup>12</sup>. However, these symptoms are mild, and they subsided in all cases. In addition, no differences were found in the magnitude of recovery of FEV<sub>1</sub> after inhalation of bronchodilator.

A positive SPT result to animal dander was found to be associated with a positive result in the bronchial challenge with MCh or AMP. Grass pollen sensitization had been previously reported by Bakirtas and Turktas<sup>13</sup> to be predictive of AMP hyperresponsiveness in school age-children, as it was the most frequent sensitizer aeroallergens in their region. We did not find any association between AHR with pollen sensitization, although this allergen is also the most frequent sensitizer in our area. Animal dander is the only perennial aeroallergen, which is clinically relevant in our region, since house dust mites are scarce due to climatic conditions. Patients who only had seasonal asthma symptoms, in whom pollen is believed to be the only aeroallergen clinically relevant, were screened out from the study to avoid

the possibility of false negative results, as AHR tests performed out of the pollen season in these patients have a low diagnostic sensitivity. Thus, no association could be found between bronchial challenge tests with sensitization to pollen.

We consider that the current study design has not influenced the results, as no differences were observed in baseline airway calibres (FVC and/or FEV<sub>1</sub>) among groups (positive and negative), in the two challenge days; MCh and AMP tests were performed in a random order, and thus is very unlikely that the MCh test might have influenced the result of AMP test or vice versa. Also, none of the patients were taking any medication that could have protected from bronchoconstriction. However, it is necessary to bear in mind that this study has been performed in a sample population comprised mainly of atopic subjects (93%) and therefore the results cannot be generalized to a different asthma population. It would be interesting to carry out a similar study in non-atopic patients.

The bronchial challenge with both agents has proven safe, accurate, appropriate and useful for diagnosis of bronchial hyperresponsiveness. The agreement in the results of both challenges points out that either test could be used in diagnosis. However, owing to its convenience and the shorter protocol, the MCh challenge should be considered in daily practice for the assessment of airway hyperresponsiveness.

## REFERENCES

1. Joos GF, O'Connor B, on behalf of the Task Force. Indirect airway challenges. *Eur Resp J* 2003; 21: 1050-1068.
2. American Thoracic Society. Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testing – 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 309-329.
3. Polosa R, Holgate ST. Adenosine bronchoprovocation: a promising marker of allergic inflammation in asthma? *Thorax* 1997;52:919-23.
4. Fowler SJ, Demsey OJ, Sims EJ, Lipworth BJ. Screening for bronchial hyperresponsiveness using methacholine and adenosine monophosphate. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1318-22.
5. EAACI. Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993; 48: 48-82.
6. American Thoracic Society. Standardization of spirometry – 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1107-36.
7. Nieminen MM, Lahdensuo A, Kellomaeki L, Karvonen J, Muittari A. Methacholine bronchial challenge using a dosimeter with controlled tidal breathing. *Thorax* 1988; 43: 896-900.
8. Nieminen MM, Holli H, Lahdensuo A, Muittari A, Karvonen J. Aerosol deposition in automatic dosimeter nebulization. *Eur J Respir Dis* 1987;71:145-152.
9. Cockcroft DW, Murdock KY, Mink JT. Determination of histamine PC20: comparison of linear and logarithmic interpolation. *Chest* 1983; 84: 505-506.
10. Ribeiro M, Pereira CAC, Nery LE, Beppu OS, Silva COS. Methacholine vs adenosine on intra and extrathoracic airway hyperresponsiveness in patients with cough variant asthma. *Allergy* 2008; 63: 527-32.

11. de Meer G, Marks GB, Postma DS. Direct or indirect stimuli for bronchial challenge testing: what is the relevante for asthma epidemiology? Clin Exp Allergy 2004;34:9-16.
12. Marks GB, Yates DH, Sist M, Ceyhan B, De Campos M, Scott DM, Barnes PJ. Respiratory sensation during bronchial challenge testing with methacholine, sodium metabisulphite and adenosine monophosphate. Thorax 1996; 51: 793-798.
13. Bakirtas A, Turktey I. Determinants of airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in school-age children with asthma. Pediatr Pulmonol 2006;41:515-21.

## CAPÍTULO 2



***USEFULNESS OF EXHALED NITRIC OXIDE FOR  
DIAGNOSING ASTHMA***

**(UTILIDAD DEL ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO EN EL DIAGNÓSTICO DE  
ASMA)**

**Autores:**

María Pedrosa, Nataly Cancelliere, Pilar Barranco,  
Valentín López-Carrasco, Santiago Quirce.

**Journal of Asthma 2010; 47: 817-821.**

**FI: 1,848**

**ISSN: 0277-0903**

**DOI: 10.3109/02770903.2010.491147**

**PMID: 20718633**





## ABSTRACT

**Rationale:** A standard asthma diagnosis is made based on clinical history, reversibility of airway obstruction, and bronchial hyperresponsiveness. Fractional exhaled nitric oxide (FeNO) is a noninvasive airway inflammatory marker that has been suggested as a diagnostic tool for asthma. The aim of this study was to establish a FeNO cut-off value for asthma diagnosis.

**Methods:** One hundred and fourteen consecutive adult patients (mean age  $34 \pm 13$  years) reporting symptoms consistent with asthma, with normal spirometric parameters and a negative bronchodilator test, were included in the study. All underwent a methacholine challenge test following the five-breath dosimeter protocol. FeNO was measured with a portable device (NioxMino, Aerocrine AB, Sweden) just before the methacholine challenge. The sensitivity, specificity, and diagnostic performance of FeNO measurement were calculated.

**Results:** Thirty-five out of the 114 patients (30.7%) were diagnosed with asthma. A positive methacholine challenge was associated with higher FeNO levels and with lower forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>) at baseline. No correlation was found between methacholine provocative concentration causing a decrease of 20% in FEV<sub>1</sub> (PC<sub>20</sub>) and FeNO levels. A receiver-operating characteristic curve was constructed for FeNO levels (area under the curve [AUC]: 0.762; 95% confidence interval [CI]: 0.667-

0.857;  $p < .001$ ). The FeNO cut-off point with maximal specificity and sensitivity for asthma diagnosis was 40 ppb.

**Conclusions:** Patients with confirmed asthma showed higher FeNO levels. A cut-off value of 40 ppb was calculated as the most efficient for asthma diagnosis in our population. The use of FeNO measurement may be a helpful tool to rule out a diagnosis of asthma, especially in patients in whom a methacholine challenge is not feasible or available.

**Keywords:** airway inflammation; asthma; diagnosis; methacholine; nitric oxide

## INTRODUCTION

Asthma is a chronic airway disease characterized by the presence of inflammatory cells and the release of proinflammatory mediators in the airways. Conventional diagnosis of asthma is made by means of the clinical history, measurement of reversible airway obstruction (response to bronchodilators), and an assessment of bronchial hyperresponsiveness by inhalation challenges (1). Nevertheless, as inflammation is a well-characterized feature of asthma, the inflammatory component should also be assessed. Fractional exhaled nitric oxide (FeNO) is an indirect measure of airway inflammation that is easy to obtain for both patients and clinicians. In the lungs, NO is generated from various cell types, including macrophages, mast cells, epithelial cells, endothelial cells, and airway smooth muscle cells (2). In patients with asthma, high levels of NO are found in exhaled breath (3), especially when eosinophilic inflammation is present, and it predicts response to steroid treatment (4).

Measurement of airway inflammation by means of FeNO may be useful and convenient for asthma diagnosis, particularly when bronchial challenges and/or spirometric maneuvers cannot be correctly performed. The main problem, however, is that there is no consensus on what level of FeNO should be used to rule in or rule out an asthma diagnosis. Recently, the Spanish Guidelines for Asthma Management (GEMA) suggested a cut-off value of 30 ppb for asthma diagnosis (5). Several studies have aimed to

evaluate FeNO measurement as a diagnostic tool in asthma (6, 7), and others have included this measurement in the diagnostic workup of chronic cough (8). Munnik et al. (9) have compared FeNO with airway responsiveness to histamine. Fortuna et al. (10) compared the diagnostic usefulness of FeNO as well as eosinophil count in induced sputum versus the methacholine inhalation challenge. As these studies differ in methodology and there is no agreement on which cut-off point should be used, we conducted a prospective cross-sectional study to establish the usefulness of FeNO measurement for asthma diagnosis (confirmed by methacholine challenge) in patients who complained of lower respiratory tract symptoms.

## METHODS

### ***Patients***

Patients were consecutively recruited among those reporting persistent symptoms consistent with asthma (shortness of breath, wheezing, and/or cough), regardless of their atopic status, and who showed normal spirometric parameters and a negative bronchodilator test. Participants aged 14 years or older were enrolled. Written informed consent was obtained from all subjects (in patients less than 18 years of age, written informed consent was obtained from their parents).

Exclusion criteria were those previously described for bronchial challenge tests (11, 12). A definitive diagnosis of asthma was made according to published asthma guidelines (11, 12) by means of consistent symptoms and a positive methacholine bronchial challenge.

### ***Skin Prick Tests***

Skin tests were performed on every patient using the prick method (13). Common environmental allergen, including house dust mites, grass, weed and tree pollen, molds (*Alternaria*, *Cladosporium*, and *Penicillium*), and animal dander (cat and dog) (ALK-Abelló, Madrid, Spain) were tested, as well as histamine (1 mg/ml) and physiologic saline solution (0.9%). Atopy was defined as the presence of at least one skin prick test to common

allergens with a wheal diameter of 3 mm or greater than the negative control (13).

### ***Spirometry***

Spirometry was performed using a Flow Screen spirometer (Vyasis Healthcare, Hoechberg, Germany) according to American Thoracic Society criteria (14). The spirometer was calibrated daily with a 3-L precision syringe (Vitalograph, Buckingham, England). Forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>), forced vital capacity (FVC), and FEV<sub>1</sub>/FVC were measured in the morning. Reference values were those published by Roca et al. (15). All patients underwent a bronchodilator test by inhaling 200 µg salbutamol.

### ***FeNO Measurement***

FeNO was measured just before the methacholine inhalation challenge, by electrochemical reaction using a portable nitric oxide analyzer (NIOX MINO™; Aerocrine, Solna, Sweden), which provides measurements at an exhalation flow rate of 50 ml/s (16).

### ***Methacholine Inhalation Challenge***

Patients were asked to stop their asthma medication before the challenge, as described elsewhere (11, 12). The methacholine inhalation challenge (MCh IC) was performed using a Spira nebulizer and an electronic dosimeter (Spira Elektro; Respiratory Care Center, Hameelinn, Finland)

following the five-breath dosimeter method (12), as previously described (17, 18). The bronchial challenge was considered positive when a decrease in FEV<sub>1</sub> from a baseline of 20% or higher was obtained after MCh inhalation. Data are presented as the provocative concentration causing a decrease of 20% in FEV<sub>1</sub> (PC<sub>20</sub>) (4, 10). The PC<sub>20</sub> was calculated using an algebraic formula (19).

### ***Statistical Analysis***

The statistic analysis was performed using SPSS v 9.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation for normally distributed variables. FeNO, were non-normally distributed variables and thus, they are presented as median and interquartile range (IQR). The association between MCh IC and clinical variables was analyzed using either the  $\chi^2$  test or Mann-Whitney test. The correlation between FeNO levels and clinical variables was performed by calculating Spearman's rho correlation coefficient, and the Mann-Whitney test for categorical variables. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of FeNO cut-off values were calculated, considering methacholine inhalation challenge outcome as the gold standard. Statistical significance was set at  $\alpha = .05$ .

## RESULTS

One hundred and fourteen patients, mean age  $34 \pm 13$  years (range 14–68) participated in the study. Clinical characteristics, data on medication, lung function values, FeNO levels, and results on MCh IC are presented in Table 1. Median FeNO level in our population was 34 ppb. It is worth noting that nearly half of these patients had concomitant rhinitis symptoms. The median FeNO in the group presenting with asthma symptoms was 30 ppb (IQR 21–56.75), whereas in the group presenting with asthma and rhinitis symptoms was 39 ppb (IQR 26–71) ( $p = .64$ ).

The FEV<sub>1</sub> values were within normal predicted reference values and bronchodilator tests were negative in all patients. The methacholine inhalation challenge was positive in 35 subjects (30.7%) and they were diagnosed with asthma. FeNO levels were significantly higher in asthmatics (58 ppb, IQR 36–112) than in nonasthmatics (30 ppb, IQR 21–42.75) ( $p < .001$ ). FEV<sub>1</sub> values were also significantly lower in asthmatic patients than in nonasthmatic subjects ( $p = .002$ ) (Table 2). There were no differences between the group with confirmed asthma diagnosis and the nonasthmatic group regarding any of the variables except atopy and positive skin prick test (SPT) to animal dander (see Table 2).



**Table 1.** Characteristics of study population (N=115)

Gender	
Male (n, %)	72 (62.6%)
Female (n, %)	43 (37.4%)
BMI (mean±SD)	24.75±5.15
Family history of atopy (n, %)	49 (42.6%)
Family history of asthma (n, %)	31 (27%)
Smoking habit	
Current smokers (n, %)	17 (14.8%)
Ex-smokers (n, %)	11 (9.6%)
Non-smokers (n, %)	87 (75.7%)
Symptoms	
Asthma (n, %)	56 (48.7%)
Rhinitis and asthma (n, %)	59 (51.3%)
Treatment	
None (n, %)	77 (67%)
SABA (n, %)	9 (7.8%)
ICS (n, %)	5 (4.3%)
ICS+LABA (n, %)	16 (13.9%)
antiLT (n, %)	3 (2.6%)
Nasal corticosteroid (n, %)	3 (2.6%)
Antihistamines (n, %)	7 (6.1%)
Atopy (n, %)	100 (87%)
Pollens (n, %)	83 (72.2%)
Mites (n, %)	31 (27%)
Moulds (n, %)	14 (12.2%)
Danders (n, %)	35 (30.4%)
Basal lung function	
FEV <sub>1</sub> (% predicted) (mean±SD)	104.29±14.95
FVC (% predicted) (mean±SD)	110.93±12.77
Positive MChIC (n, %)	35 (30.4%)

BMI: Body Mass Index; SABA: short acting beta agonists; ICS: inhaled corticosteroids; ICS+LABA: inhaled corticosteroids + long acting beta agonists; antiLT: leukotriene antagonist receptors; FEV<sub>1</sub>: forced expired volume in one second; FVC: forced vital capacity; MChIC: methacholine inhalation challenge. SD: standard deviation; IQR: interquartile range.

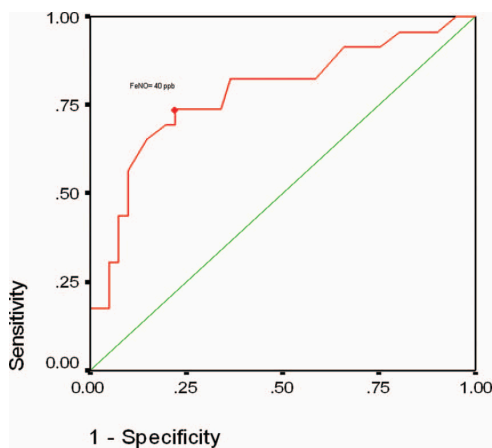
**Table 2.** Comparison of study variables according to asthma diagnosis

	<b>Asthmatics (MChIC +)</b>	<b>Non-asthmatics (MChIC -)</b>	<b>P</b>
Age (mean±SD)	36.5±14.6	32.89±13.04	N.S.
Gender			N.S.
Male(n, %)	16 (45.7%)	27 (33.8%)	
Female (n, %)	19 (54.3%)	53 (66.3%)	
BMI (mean±SD)	25.37±6.62	24.48±4.38	N.S.
Family history atopy (n, %)	16 (45.7%)	33 (41.3%)	N.S.
Family history asthma (n, %)	11 (31.4%)	20 (25%)	N.S.
Smoking habit			N.S.
Current smokers (n, %)	5 (14.3%)	12 (15%)	
Ex-smokers (n, %)	5 (14.3%)	6 (7.5%)	
Non-smokers (n, %)	25 (71.4%)	62 (77.5%)	
Symptoms			N.S.
Asthma (n, %)	18 (51.4%)	38 (47.5%)	
Rhinitis & asthma (n, %)	17 (48.6%)	42 (52.5%)	
Treatment			
None (n, %)	21 (60%)	56 (70%)	N.S.
SABA (n, %)	4 (11.4%)	5 (6.3%)	N.S.
ICS (n, %)	3 (8.6%)	2 (2.5%)	N.S.
ICS+LABA (n, %)	7 (20%)	9 (11.3%)	N.S.
LTRA (n, %)	1 (2.9%)	2 (2.5%)	N.S.
Nasal CS (n, %)	1 (2.9%)	2 (2.5%)	N.S.
Antihistamines (n, %)	0 (0%)	7 (8.8%)	N.S.
Atopy (n, %)	34 (97.1%)	66 (82.5%)	<b>.036</b>
Pollen (n, %)	26 (74.3%)	57 (71.3%)	N.S.
Mites (n, %)	8 (22.9%)	23 (28.8%)	N.S.
Moulds (n, %)	7 (8.8%)	7 (20%)	N.S.
Dander (n, %)	17 (48.6%)	18 (22.5%)	<b>.008</b>
Basal lung function			
FEV <sub>1</sub> (%pred) (mean±SD)	97.91±15	107.09±14.1	<b>.002</b>
FVC (%pred) (mean±SD)	110.32±13.36	111.2±12.57	N.S.
PC <sub>20</sub> Mch (median, IQR)	3.07 (0.74-9.89)		
FeNO (median, IQR)	58 (36-112)	29.5 (21-43)	<b>.000</b>

BMI: Body Mass Index; SABA: short acting beta agonists; ICS: inhaled corticosteroids; ICS+LABA: inhaled corticosteroids + long acting beta agonists; LTRA: leukotriene receptor antagonists; FEV<sub>1</sub>: forced expired volume in one second; FVC: forced vital capacity; MChIC: methacholine inhalation challenge

FeNO levels were not correlated with any of the following variables: age, gender, body mass index (BMI), smoking habit, atopy, lung function values, symptoms, and medication. No correlation was found between FeNO and PC<sub>20</sub> in asthmatic patients ( $r=-.14$ ).

The receiver-operating characteristic (ROC) curve for FeNO levels is shown in Figure 1. The mean area under the curve (AUC) was 0.762 (95% confidence interval [CI]: 0.667-0.857;  $p = .000$ ). A cut-off point with maximal sensitivity (74.3%) and specificity (72.5%) was calculated for FeNO values at 40 ppb. According to this cut-off value, predictive values for asthma diagnosis were calculated: positive predictive value (PPV) 54.2% and negative predictive value (NPV) 86.6%.



**Figure 1.** Receiver-operating characteristic curve for FeNO

## DISCUSSION

The prevalence of confirmed asthma in our population was 30.4%. The optimal value of FeNO (using NIOX MINO, at a flow rate of 50 ml/s) for the diagnosis of asthma was 40 ppb, with a sensitivity of 74% and a specificity of 72.5%.

Asthma is a chronic disease of the airways characterized by bronchial inflammation (usually but not always eosinophilic), variable airflow limitation, and bronchial hyperresponsiveness (20, 21). Measuring the differential cell count in induced sputum (particularly percentage of eosinophils) is the best non-invasive tool to assess bronchial inflammation, but the procedure is time-consuming and requires technical skills, which limits its clinical applicability. Because a significant relationship between FeNO and both sputum eosinophils and bronchial hyperresponsiveness has been previously reported (22, 23), it seems sensible to use FeNO as a surrogate of airway inflammation. Several studies have shown that FeNO levels are increased in steroid-naïve asthmatics (22, 24, 25). The performance of FeNO measurement as a diagnostic tool in asthma has been previously evaluated (6, 7). However, although diagnostic accuracy was high, comparisons were made with asthma diagnosis, as determined by a positive bronchodilator test or inhalation challenge (6), or with lung function (7). In the study of Dupont et al. (6), patients were recruited among those presenting with symptoms suggestive of obstructive airway disease, and the diagnosis of asthma was made by means of a positive

bronchodilator test or a positive histamine challenge. A cut-off point of 16 ppb was calculated with a specificity of 90%, but it had a lower sensitivity (69.4%). The results of that study are not comparable with our study, as measurement of NO was performed with a chemiluminescence analyzer at a flow rate of 200 ml/s (6). In the study of Malmberg et al. (7) the study population was children, the diagnosis was made by means of lung function and response to bronchodilators, and FeNO was measured by chemiluminescence at a flow rate of 50 ml/s. Another study (8) reported the use of FeNO in chronic cough for the diagnosis of asthma. Munnik et al. (9) assessed the relationship of FeNO measurement with asthma diagnosis and bronchial hyperresponsiveness to histamine. The study was performed with two different methods of measuring FeNO since it was conducted in two centers, and the authors stated that there might be a bias in the study because they lack a true gold standard for diagnosis, which was made based on medical history, pulmonary function, and a bronchial hyperresponsiveness test. In our study, we demonstrated a good relationship between FeNO level and methacholine inhalation challenge outcome (positive *versus* negative) ( $p < .001$ ), but no correlation was found between FeNO levels and methacholine PC<sub>20</sub> values ( $r = -.14$ ). Berkman et al. (26) undertook a study to determine whether FeNO measurement could be used to diagnose asthma in patients with nonspecific respiratory symptoms. However, a clinical diagnosis of asthma was used as the gold standard, instead of bronchial challenge tests. A cut-off point of FeNO >7

ppb (at a flow rate of 250 ml/s) best differentiated asthmatic and nonasthmatic subjects (sensitivity 82.5%, specificity 88.9%).

Among patients with relevant respiratory symptoms, normal spirometric parameters and negative bronchodilator response, which is a common clinical scenario, we followed the diagnostic algorithm proposed by the Global Initiative for Asthma (GINA) (1), using the result of the bronchial challenge to MCh to confirm the asthma diagnosis. The relationship between FeNO and bronchial provocation challenge has been previously reported by Smith et al. (27). In their study, an optimal cut-off point of 20 ppb (at a flow rate of 50 ml/s) was established for diagnosing asthma, based on predictive accuracy. This value showed a sensitivity of 88% and specificity of 79%. Another study, which also included patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), calculated a 46 ppb cut-off point for FeNO levels in the diagnosis of asthma, although it had poor diagnostic sensitivity (34%) (28). Fortuna et al. (10), using a conventional chemiluminescence analyzer at a flow rate of 50 ml/s, calculated a cut-off value of 23 ppb to best distinguish between asthmatic and nonasthmatic subjects, with an accuracy of 80%. These authors, in another study using the NIOX MINO, proposed a cut-off point of 34 ppb (29).

In our population, the value of FeNO with best sensitivity and specificity was 40 ppb, with a good negative predictive value (86.6%), and an overall diagnostic accuracy of 73%. This cut-off point could, therefore, be used as part of the diagnostic strategy for asthma, especially to rule out an asthma

diagnosis in patients with normal spirometric parameters and negative bronchodilator test. We propose including FeNO measurement in decision trees as a step prior to bronchial inhalation challenges, in order to avoid unnecessary provocation tests, which are time-consuming and are not exempt from possible adverse effects. In addition, FeNO measurement is easy to perform for the patient, time-saving for the staff, and safe for both.

## REFERENCES

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy For Asthma Management and Prevention: NHLBI/WHO Workshop Report. Washington, DC: US Government Printing Office, 2009. NHLBI Publication 2009.
2. Suresh V, Mih JD, George SC. Measurement of IL-13-induced iNOS-derived gas phase nitric oxide in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37:97–104.
3. Delclaux C, Mahut B, Zerah-Lancner F, Delacourt C, Laoud S, Cherqui D, Duvoux C, Mallat A, Harf A. Increased nitric oxide output from alveolar origin during liver cirrhosis versus bronchial source during asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:332–337
4. Zacharasiewicz A. Fractional exhaled nitric oxide and induced sputum. *Paediatr Respir Rev* 2007; 8:94–96.
5. GEMA. *J Investig Allergy Clin Immunol* 2010; 20(Suppl 1).
6. Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest* 2003; 123: 751–756.
7. Malmberg LP, Pelkonen AS, Haahtela T, Turpeinen M. Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes children with probable asthma. *Thorax* 2003; 58:494–499.
8. Chatkin JM, Ansarin K, Silkoff PE, McClean P, Gutiérrez C, Zamel N. Exhaled nitric oxide as a non invasive assessment of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1810–1813.
9. Munnik P, Van Der Lee I, Fijn J, van Eijdsden LJ, Lammers JWJ, Zanen P. *Respir Med* (in press).
10. Fortuna AM, Freixas T, Gonzáales M, Casan P. Diagnostic utility of inflammatory biomarkers in asthma: exhaled nitric oxide and induced sputum eosinophil count. *Respir Med* 2007; 101:2416–2421.



11. Joos GF, O'Connor B. On behalf of ERS Task Force. Indirect airway challenges. *Eur Respir J* 2003; 21:1050–1068.
12. American Thoracic Society. Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testing-1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 309–329.
13. EAACI. Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993; 48:48–82.
14. American Thoracic Society. Standardization of spirometry-1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1107–1136.
15. Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodríguez-Roisin R, Casan P, Sans S. Spirometric reference values for a mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986; 22:217–224
16. Menzies D, Nair A, Lipworth BJ. Portable nitric oxide measurement. Comparison with the “gold Standard” technique. *Chest* 2007; 131:410–414.
17. Pedrosa M, Barranco P, Caminoa M, Botello MD, Quirce S. Comparison of Methacholine and Adenosine inhalation challenge in patients with suspected asthma. *J Asthma* 2009; 46:773–776.
18. Barranco P, Delgado J, Sastre J, Vega JM, Pacual MJ, Barranco R, García-Río F, Parra A, Quirce S. Obesity is not associated with mild asthma diagnosis in a population of Spanish adults. *J Asthma* 2009; 46:867–871.
19. Cockcroft DW, Murdock KY, Mink JT. Determination of histamine PC20: comparison of linear and logarithmic interpolation. *Chest* 1983; 84: 505–506.
20. Djukanivoc R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:434–457.
21. Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 42:3–10.

22. Jatakanon A, Sim L, Kharitonov S, Chung K, Barnes P. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998; 53: 91–95.
23. Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, Flannery EM, Hancox RJ, MacLachlan CR, Taylor DR. The predictive values of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:738–743.
24. Al-Ali MK, Eames C, Howarth PH. Exhaled nitric oxide: relationship to clinicophysiological markers of asthma severity. *Respir Med* 1998; 92:908–913.
25. Lim S, Jatakanon A, Meah S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderately severe asthma. *Thorax* 2000; 55:184–188.
26. Berkman N, Avital A, Breuer R, Bardach E, Springer C, Godfrey S. Exhaled nitric oxide in the diagnosis of asthma: comparison with bronchial provocation tests. *Thorax* 2005; 60:383–388.
27. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, Taylor R. Comparison between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:473–478.
28. Schneider A, Tilemann L, Schermer T, Gindner L, Laux G, Szecseny J, Meyer FJ. Diagnosing asthma in general practice with portable exhaled nitric oxide measurement-results of a prospective diagnostic study. *Respir Res* 2009; 10:15–25.
29. Fortuna AM, Freixas T, Casan P. Measurement of fraction of exhaled nitric oxide with the portable NIOX-MINO monitor in healthy adults. *Arch Bronconeumol* 2007; 43:176–179.

## CAPÍTULO 3



***CHANGES IN EXHALED NITRIC OXIDE LEVELS AFTER  
BRONCHIAL ALLERGEN CHALLENGE***

**(CAMBIOS EN LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO TRAS  
PROVOCACIÓN BRONQUIAL CON ALÉRGENO)**

**Autores:**

María Pedrosa, Pilar Barranco,  
Valentín López-Carrasco, Santiago Quirce.

**Lung 2012; 190: 209-214.**

**FI: 2,062**

**ISSN: 0341-2040**

**DOI: 10.1007/s00408-011-9358-4**

**PMID: 22228508**



## ABSTRACT

**Background:** Fractional exhaled nitric oxide (FeNO) is a marker of inflammation of the airways accompanying changes in the clinical condition of asthma. Allergen exposure has been associated with a delayed elevation of FeNO. The aim of this study was to assess airway inflammation with FeNO measurements during bronchial allergen challenge (BAC), and to determine the diagnostic performance of FeNO changes.

**Methods:** Thirty-four patients with asthma and sensitization to inhalant allergens were studied. BAC with common or high-molecular-weight occupational aeroallergens was performed. FeNO was measured before and 24 h after BAC. Receiver operating characteristics curve was built to assess the sensitivity and specificity of increase in FeNO levels associated with BAC outcome.

**Results:** In 21 patients (61.76%) a positive asthmatic reaction (responders) was observed. A significant increase in postchallenge FeNO was observed in this group of patients compared to the group of nonresponders. A median increase (FeNO postchallenge–FeNO prechallenge) of 14.0 ppb was observed in the group of responders, whereas a -1.0 ppb change was attained in the nonresponder group ( $p < 0.001$ ). The cutoff point providing maximal sensitivity and specificity for  $\% \Delta \text{FeNO}$  after BAC was 12%. This change in FeNO levels has a sensitivity of 0.81 and a specificity of 0.92 for predicting a positive outcome in the BAC.

**Conclusion:** FeNO measurements can be used as a surrogate of airway inflammation accompanying the asthmatic reaction induced by BAC. FeNO measurements may be a useful and reliable tool in the monitoring and interpreting specific bronchial challenge test with allergens.

**Keywords** Exhaled nitric oxide; Bronchial allergen challenge; Asthma; Eosinophilic inflammation.



## INTRODUCTION

Changes in the level of fractional exhaled nitric oxide (FeNO) reflect changes in the inflammatory status of the airways [1–3]. Increased levels of FeNO have been observed in patients with asthma, produced by the inducible nitric oxide synthase (iNOS) that is upregulated as a result of augmented production of inflammatory mediators in the asthmatic airways [4, 5]. It is thought that the increase in FeNO in asthma depends primarily on the activity of IL-4/IL-13, inducing iNOS expression in the bronchial epithelium via the STAT-6 pathway [6]. FeNO has been found to correlate with the number of eosinophils and the level of eosinophilic cationic protein (ECP) in induced sputum [7–9], suggesting that FeNO reflects eosinophilic inflammation in asthma [10]. However, more recently FeNO has been regarded as a signal of allergen-triggered Th2-driven inflammatory mechanisms within the bronchial mucosa [6].

Although experimental allergen bronchial provocation challenge does not completely reproduce allergenic exposure [11], it is widely used in research on the pathogenesis of allergic airway diseases. Besides the early asthmatic response, allergen inhalation can induce a late-phase response characterized by airway infiltration by activated eosinophils [12], which is associated with an increase in bronchial hyperresponsiveness that resembles that of clinical asthma [13].

The assessment of FeNO levels is totally noninvasive, rapid, and relatively simple to perform compared to other techniques such as sputum induction and processing. After bronchial allergen challenges, elevated FeNO levels have been reported in subjects with late or dual asthmatic responses [14, 15], but also in subjects with early asthmatic responses [16]. However, the usefulness of FeNO measurements for predicting the outcome of bronchial allergen challenge (BAC) has not been previously evaluated.

In this study we aimed to investigate the relationship between allergen exposure by means of BAC and airway inflammation, measured by changes in FeNO before and 24 h after the specific inhalation challenge. The diagnostic performance of this marker of airway inflammation was assessed.

## METHODS

### *Patients*

Thirty-four patients with asthma who were sensitized to common aeroallergens or high-molecular-weight occupational allergens were evaluated at the Allergy Department of University Hospital La Paz (Madrid, Spain) between June 2009 and June 2010. The study was approved by the Ethics and Clinical Investigation Committee of the University Hospital La Paz. Written informed consent was obtained from all patients prior to the inclusion in the study. Suspicion of allergic asthma was based on asthma-like symptoms, specific IgE measurements (by means of skin prick test and/or specific IgE measurements), and lung function tests. Asthma diagnosis was confirmed in all subjects according to established criteria [17].

### *Skin Prick Tests*

Skin tests were performed on every patient using the prick method [18]. Common environmental allergens, including house dust mites, grass, weed and tree pollen, molds (*Alternaria*, *Cladosporium*, and *Penicillium*), and animal dander (cat and dog) (ALK-Abelló, Madrid, Spain) were tested, as well as histamine (10 mg/ml) and physiologic saline solution (0.9%). High-molecular-weight allergens involved in occupational asthma cases were also tested (in-house extracts at 10% wt/vol). Atopy was defined as the

presence of at least one skin prick test to common allergens, with a wheal diameter of 3 mm or greater than the negative control [18].

### ***Spirometry***

Spirometry was performed using a Flow Screen spirometer (Vyasis Healthcare GmbH, Hoechberg, Germany) according to American Thoracic Society criteria [19]. The spirometer was calibrated daily with a 3-L precision syringe (Vitalograph Ltd, Buckingham, UK). Forced expiratory volume in 1 second (FEV<sub>1</sub>), forced vital capacity (FVC), and FEV<sub>1</sub>/FVC were measured in the morning. Reference values were those published by Roca et al. [20]. All patients underwent a bronchodilator test by inhaling 200 µg salbutamol.

### ***FeNO Measurement***

FeNO was measured by electrochemical reaction using a portable nitric oxide analyzer (NioxMino™, Aerocrine, Solna, Sweden), which provides measurements at an exhalation flow rate of 50 ml/s [21]. Baseline FeNO (FeNO<sub>pre</sub>) was obtained just before the first spirometric maneuver of the allergen inhalation challenge. FeNO levels were measured again 24 h after the allergen challenge (FeNO<sub>post</sub>), prior to the spirometry. Increase in FeNO ( $\Delta$ FeNO) levels was obtained by the subtraction of FeNO<sub>post</sub> from FeNO<sub>pre</sub>. Percent increase of FeNO was obtained from the level of  $\Delta$ FeNO divided by FeNO<sub>pre</sub>.

### ***Bronchial Allergen Challenge***

Bronchial allergen challenges were performed in the pulmonary function laboratory at the hospital setting. The absence of contraindications and medication withdrawal requirements for BAC as stated elsewhere were ensured [22]. BAC was carried out with the suspected allergen according to the clinical history and results of allergy tests.

Baseline spirometric measurements were performed prior to the challenge. The test was performed using an electronic dosimeter (Spire Elektro, Respiratory Care Center, Hameelinna, Finland) with an output of 0.45  $\mu$ l and a nebulization time of 0.6 s as previously described [23]. The patient inhaled the aerosolized allergen using a five-breath dosimeter protocol in progressive concentrations [24]. A control challenge with isotonic saline solution was carried out before antigen provocation. Increasing concentrations of allergen were given by inhalation starting with a concentration that induced a 2-mm wheal on skin prick test. The dose was increased in five-fold increments at intervals of 10 min and FEV<sub>1</sub> was measured at 5–10 min after inhalation of each concentration. The inhalation challenge test was discontinued when there was a fall in FEV<sub>1</sub> of  $\geq 20\%$  from the lowest postsaline value or when the highest concentration had been given. At the end of the inhalation test, spirometry was performed at 20, 30, 40, 60, and 120 min after challenge. From that moment, PEF measurements were performed hourly with a portable peak flow meter (up to 24 h after challenge, except for sleep time). A fall in FEV<sub>1</sub> of  $\geq 20\%$  from the lowest

post-saline value within 60 min of challenge was considered a positive early asthmatic response, and a similar fall in PEF between 2 and 24 h after challenge was considered a late asthmatic response if no change was observed during the control day. Patients were monitored in the laboratory for at least 3 h after the challenge. Written instructions were given to the patients to treat a late asthmatic response.

### ***Statistical Analysis***

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, except for FeNO and IgE levels which are expressed as median and interquartile range (IQR) as they did not follow a normal distribution. Comparisons between groups were performed with Student's t test for normally distributed variables and with the Mann-Whitney U test for non-normally distributed variables. The Kruskal-Wallis test was used to compare differences between various groups. The association between changes in FeNO levels pre- and post- BAC and the outcome of the challenge was assessed using receiver operating characteristics (ROC) curves. Significance was set at  $\alpha = 0.05$ . Data were analyzed with SPSS v11.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL).

## RESULTS

Thirty-four adult patients were investigated. Twenty-one subjects showed a positive BAC and 13 showed a negative inhalation challenge. The clinical characteristics of the patients are presented in Table 1.

At baseline, no differences in FeNO levels were observed between subjects with a positive BAC and those who had a negative challenge test result. Similar results were obtained when current smokers were excluded from the analysis (Table 1). There was an increase in FeNO levels 24 h after exposure (mean= +14 ppb) in patients who had a positive BAC but not in those with a negative BAC; they actually showed a decrease (mean = -1 ppb) as shown in Table 2. This difference was statistically significant ( $P<0.001$ ).

**Table 1.** Characteristics of the study patients

Characteristics	Positive BAC (N=21)	Negative BAC (N=13)
Age (yr.)	34.24±10	32.08±7.09
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	24.67±3.54	24.37±4.04
Smoking habit (cs/ns/exs)	6/10/5	0/11/2
Total IgE (kU/L) (median, IQR)	354.5 (164.5-863.8)	180.0 (68.3-237.0)
Current ICS treatment	4 (19%)	0
BAC agent		
- Mites	1	2
- Animal dander	15	7
- Latex	0	2
- Cereal flour	3	1
- Others	2	1
FEV <sub>1</sub> (L)	3.46±1.02	3.20±0.71
FEV <sub>1</sub> (% predicted)	99.26±13.38	98.89±18.92
FVC (L)	4.62±1.47	4.04±0.91
FVC (% predicted)	111.06±15.31	106.14±16.75
FEV <sub>1</sub> /FVC	75.56±6.29	79.55±6.98
Type of asthmatic reaction (E/L/D)	7/3/11	-
Baseline FeNO (ppb) median (IQR)	68.0 (45.0-80.5)	46.0 (28.0-76.0)
Baseline FeNO (ppb) median (IQR), smokers excluded	56.5 (47.5-73.5)	46.0 (28.0-76.0)

Data given as mean±SD unless otherwise stated. cs: current smoker; ns: non-smoker; exs: exsmoker; IQR: interquartile range; ICS: inhaled corticosteroids. E: early; L: late; D: dual.



**Table 2.** FeNO measurements at baseline, 24 hours after BAC and incremental FeNO

	Positive BAC (n=21)		Negative BAC (n=13)	
	Baseline	24 h post-BAC	Baseline	24 h post-BAC
FeNO (ppb)	68.0 (45.0 - 80.5)	85.0 (67.5 - 108.0)	46.0 (28.0 - 76.0)	39.0 (24.5 - 70.5)
ΔFeNO (ppb)	14.0 (7.0 - 37.0)*		-1.0 (-8.0 - 5.0)*	

Data are expressed as median and interquartile range.

\*p<0.001

In subjects with a positive BAC, the changes in FeNO levels during the challenge were not significantly different (P = 0.83) according to the type of asthmatic response they showed (Table 3). Similar levels of FeNO were found in subjects treated with inhaled corticosteroids (median = 76.5 ppb; IQR = 59-89.5) compared with steroid-naïve subjects (median = 58.5 ppb; IQR = 35 - 72) (P = 0.59).

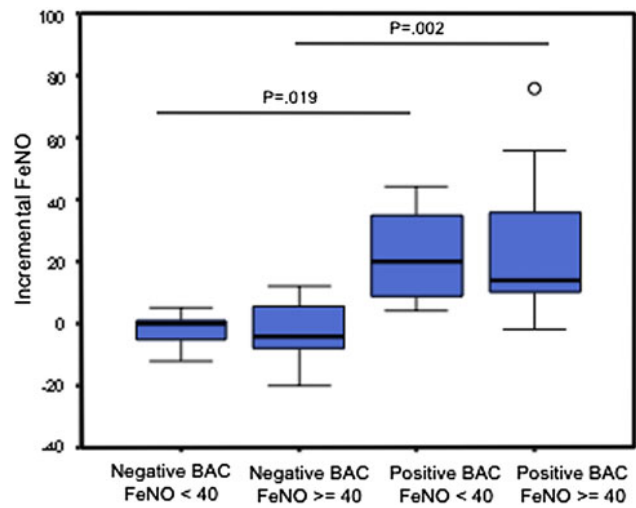
**Table 3.** FeNO measurements according to the type of asthmatic reaction

	Early reaction (n=7)		Late/Dual reaction (n=14)	
	Baseline	24 h post BAC	Baseline	24 h post BAC
FeNO (ppb)	68.0 (45.0-93.5)	79.0 (76.5-120.5)	68.0 (51.3-72.0)	85.5 (66.8-105.0)
ΔFeNO (ppb)	26 (5.5-50.0)*		14.0 (12.3-33.5)*	

Data are expressed as median and interquartile range.

\*p=0.25

We investigated whether baseline FeNO levels influenced the increase in postchallenge FeNO. We considered normal FeNO values those <40 ppb [25], and thus we compared the increase in FeNO in subjects with a positive versus a negative BAC outcome, subdividing them into prechallenge FeNO lower or higher than 40 ppb. Changes in incremental FeNO were statistically significant in both the normal (<40 ppb) baseline FeNO group ( $P = 0.019$ ) and the high ( $\geq 40$  ppb) baseline FeNO group ( $P = 0.002$ ). This points out that the increase in FeNO after BAC depends on the outcome of the challenge rather than on the baseline FeNO levels (Fig. 1), which was confirmed by multivariate analysis ( $P < 0.001$ ).



**Figure 1.** Increase in FeNO levels depends on BAC outcome rather than on basal FeNO

A ROC curve was built to assess the sensitivity and specificity of the increase in FeNO levels associated with BAC outcome. The area under the curve (AUC) was 0.903 for absolute  $\Delta\text{FeNO}$  (95% CI = 0.805–1.001;  $P<0.001$ ) and 0.886 for percent  $\Delta\text{FeNO}$  (95% CI = 0.773–1.00;  $P<0.001$ ). A cut-off point providing maximal sensitivity and specificity was identified for % $\Delta\text{FeNO}$  of 12%. This change in FeNO levels has a sensitivity of 0.81 and a specificity of 0.92 for predicting a positive outcome in the BAC. The diagnostic performance of a 12% increase in FeNO after BAC is shown in Table 4. The same was calculated for absolute  $\Delta\text{FeNO}$ , which was set at 8 ppb and showed slightly lower sensitivity (0.76) but the same specificity.

**Table 4.** Diagnostic performance of an increase in FeNO  $\geq 12\%$  after bronchial allergen challenge

	$\Delta\text{FeNO} \geq 12\%$
Sensitivity	80.95%
Specificity	92.31%
PPV	94.44%
NPV	75.00%
Diagnostic accuracy	85.29%
Positive likelihood ratio	10.52
Negative likelihood ratio	0.21

PPV: Positive predictive value; NPV: Negative predictive value.

## DISCUSSION

This study shows that FeNO levels are increased 24 h after allergen exposure in subjects with a positive BAC. This observation is consistent with previous studies that used common [14–16, 26] and occupational allergens [27, 28]. The increase in FeNO levels may be due to iNOS activation by IL-1 and TNF- $\alpha$  [29], which are abundant in bronchoalveolar lavage at the time of the asthmatic response [30, 31]. There were no differences in FeNO levels in steroid-treated versus steroid-naïve subjects; this may be because use of inhaled corticosteroids was stopped 72 h prior to the challenge, which is sufficient to avoid the suppression of FeNO levels [32].

The kinetics of changes in FeNO after BAC has been assessed at different time points in several studies. In patients with positive asthmatic responses, FeNO was elevated starting from the eighth hour postchallenge onward, and it was still elevated 48 [33] and 72 h after the BAC [16]. In patients with dual asthmatic responses, the maximal FeNO increase has been reported to be 10 h after challenge [14, 15]. Measurement of FeNO in occupational studies was obtained 20–24 h after challenge [7, 27, 34–37]. A study carried out in farmers, bakers, and healthcare workers showed increased FeNO levels 24 h after BAC, along with a rise in the proportion of eosinophils in induced sputum in subjects with occupational asthma. A significant correlation was found between the FeNO level at 24 h after BAC and the percentage of eosinophils in sputum before and 24 h after BAC [27]. These

data suggest that 24 h after BAC is an adequate time point to measure FeNO. Changes observed in FeNO after exposure to occupational agents have been reported to depend on the baseline levels of FeNO [36]. Nevertheless, in contrast with the results reported by Piipari et al. [36], no differences in baseline FeNO levels between the group with positive and the group with negative BAC were found in our study.

Unlike previous studies [14, 15], we did not find any difference in the increase in FeNO levels when considering the type of asthmatic response (early vs. late/dual). However, our results are in line with those of other studies showing that the increase in eosinophils in sputum is similar in subjects with isolated early or dual asthmatic responses [38, 39].

Using the ROC curve, an increment in FeNO levels of 12% achieved good discriminating sensitivity and specificity, suggesting that measurements of FeNO before and 24 h after BAC may be helpful as a diagnostic test. This increase achieved good positive and negative predictive values and may help in the interpretation of BAC in some cases. Similarly, Lemie`re et al. [38] investigated which changes in sputum eosinophil numbers and bronchial responsiveness to methacholine should be regarded as clinically significant for predicting a 20% fall in FEV<sub>1</sub> after specific inhalation challenge, but they did not measure FeNO levels in their study.

From a pathophysiological point of view, it is worth underscoring the significant changes observed in FeNO levels after BAC and the good diagnostic performance of a 12% increase in postchallenge FeNO,

supporting the concept that FeNO is a signal of allergen-triggered Th2-driven inflammatory mechanisms within the bronchial tree [6].

In conclusion this study highlights the importance of FeNO measurements as a useful and reliable tool in the monitoring and interpretation of specific bronchial challenge tests with allergens.

## REFERENCES

1. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM (1993) Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 6:1368–1370
2. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Sinebourne EA, Barnes PJ (1994) Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 343:133–135
3. Person MG, Zetterström O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE (1994) Single breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 343:146–147
4. Robbins RA, Springall DR, Warren JB et al (1994) Inducible nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 198:835–843
5. Silkoff PE (2000) Noninvasive measurements of airway inflammation using exhaled nitric oxide and induced sputum: current status and future use. *Clin Chest Med* 21:345–360
6. Alving K, Malinovschi A (2010) Basic aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir Mon* 49:1–31
7. Obata H, Dittrick M, Chan H, Chan-Yeung M (1999) Sputum eosinophils and exhaled nitric oxide during late asthmatic reaction in patients with red cedar asthma. *Eur Respir J* 13:489–495
8. Chang-Yeung M, Obata H, Dittrick M, Chan H, Abboud R (1999) Airway inflammation, exhaled nitric oxide and severity of asthma in patients with red cedar asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1434–1438
9. Silvestri M, Spallarossa D, Frangova Yourukova V, Battistini E, Fregonese B, Rossi GA (1999) Orally exhaled nitric oxide levels are related to the degree of blood eosinophilia in atopic children with mild-intermittent asthma. *Eur Respir J* 13: 321–326
10. Bates CA, Silkoff PE (2003) Exhaled nitric oxide in asthma: from bench to the bedside. *J Allergy Clin Immunol* 111:256–262

11. Platts-Mills TAE, Heymann PW, Longbottom JL, Wilkins SR (1986) Airborne allergens associated with asthma: particle sizes carrying dust mite and rat allergens measured with a cascade impactor. *J Allergy Clin Immunol* 77:850–857
12. De Monchy JG, Kauffman HF, Venge P, Koëter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, De Vries K (1985) Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 131:373–376
13. Durham SR, Graneek BJ, Hawkins R, Newman Taylor AJ (1987) The temporal relationship between increases in airway hyperresponsiveness to histamine and late asthmatic responses induced by occupational agents. *J Allergy Clin Immunol* 79: 398–406
14. Kharitonov SA, O'Connor BJ, Evans DJ, Barnes PJ (1995) Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1894–1899
15. Paredi P, Leckie MJ, Horvath I, Allegra L, Kharitonov SA, Barnes PJ (1999) Changes in exhaled carbon monoxide and nitric oxide levels following allergen challenge in patients with asthma. *Eur Respir J* 13:48–52
16. Swiebocka E, Siergiejko G, Siergiejko Z (2011) Bronchial allergen challenge in allergic children: continuous increase of nitric oxide in exhaled air 72 hours after allergen inhalation independent of bronchial obstruction. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 24:17–24
17. GEMA 2009 (2010) Spanish guideline on the management of asthma. Executive Committee GEMA 2009. *J Investig Allergol Clin Immunol* 20 (1):1–59
18. Dreborg S, Frew AJ (1993) EAACI Position paper: allergen standardization and skin tests. The European academy of allergology and clinical immunology. *Allergy* 48(14):48–82
19. American Thoracic Society (1995) Standardization of spirometry-1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1107–1136



20. Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodriguez-Roisin R, Casan P, Sans S (1986) Spirometric reference values for a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 22:217–224
21. Menzies D, Nair A, Lipworth BJ (2007) Portable nitric oxide measurement. Comparison with the “gold standard” technique. *Chest* 131:410–414
22. Melillo G, Bonini S, Cocco G, Davies RJ, de Monchy JG, Frølund L, Pelikan Z (1997) EAACI provocation tests with allergens. Report prepared by the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee on provocation tests with allergens. *Allergy* 52:1–35
23. Letrán A, Palacín A, Barranco P, Salcedo G, Pascual C, Quirce S (2008) Rye flour allergens: an emerging role in baker’s asthma. *Am J Ind Med* 51:324–328
24. Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, McLean JA, Rosenthal RR et al (1975) Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol* 56:323–327
25. Pedrosa M, Cancelliere N, Barranco P, López-Carrasco V, Quirce S (2010) Usefulness of exhaled nitric oxide for diagnosing asthma. *J Asthma* 47:817–821
26. Ihre E, Gyllfors P, Gustafsson LE, Kumlin M, Dahle’n B (2006) Early rise in exhaled nitric oxide and mast cell activation in repeated low-dose allergen challenge. *Eur Respir J* 27:1152–1159
27. Swierczynska-Machura D, Krakowiak A, Wiszniewska M, Dudek W, Walusiak J, Pałczynski C (2008) Exhaled nitric oxide levels after specific inhalatory challenge test in subjects with diagnosed occupational asthma. *Int J Occup Med Environ Health* 21: 219–225
28. Quirce S, Lemièrre C, de Blay F, del Pozo V, Van Gerth Wijk R, Maestrelli P, Pauli G, Pignatti P, Raulf-Heimsoth M, Sastre J, Storaas T, Moscato G (2010) Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. *Allergy* 65:445–458

29. Robbins RA, Barnes PJ, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LD, Wilson AJ, Geller DA, Polak JM (1994) Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 203:209–218
30. Ohkawara Y, Yamauchi K, Tanno Y, Tamura G, Ohtani H, Nagura H, Ohkuda K, Takishima T (1992) Human lung mast cells and pulmonary macrophages produce tumor necrosis factor-alpha in sensitized lung tissue after IgE receptor triggering. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:385–392
31. Virchow JC, Walker C, Hafner D, Kortsik C, Werner P, Matthys H, Kroegel C (1995) T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 151:960–968
32. Lemièrre C, D'Alpaos V, Chaboillez S, César M, Wattiez M, Chiry S, Vandenplas O (2010) Investigation of occupational asthma: sputum cell counts or exhaled nitric oxide? *Chest* 137: 617–622
33. Ricciardolo FLM, Timmers MC, Sont JK, Folkerts G, Sterk PJ (2003) Effect of bradykinin on allergen induced increase in exhaled nitric oxide in asthma. *Thorax* 58:840–845
34. Baur X, Barbinova L (2005) Latex allergen exposure increases exhaled nitric oxide in symptomatic healthcare workers. *Eur Respir J* 25:309–316
35. Allmers H, Chen Z, Barbinova L, Marczynski B, Kirschmann V, Baur X (2000) Challenge from methacholine, natural rubber latex, or 4,4-diphenylmethane diisocyanate in workers with suspected sensitization affects exhaled nitric oxide (change in exhaled NO levels after allergen challenges). *Int Arch Occup Environ Health* 73:181–186
36. Piipari R, Piirilä P, Keskinen H, Tuppurainen M, Sovijärvi A, Nordman H (2002) Exhaled nitric oxide in specific challenge tests to assess occupational asthma. *Eur Respir J* 20:1532–1537
37. Barbinova L, Baur X (2006) Increase in exhaled nitric oxide (eNO) after work-related isocyanate exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 79:387–395.

38. Lemière C, Chaboillez S, Malo JL, Cartier A (2001) Changes in sputum cell counts after exposure to occupational agents: what do they mean? *J Allergy Clin Immunol* 107:1063–1068.
39. Fernández-Nieto M, Sastre B, Sastre J, Lahoz C, Quirce S, Madero M, del Pozo V (2009) Changes in sputum eicosanoids and inflammatory markers after inhalation challenges with occupational agents. *Chest* 136:1308–1315.



## **DISCUSIÓN GENERAL**



## DISCUSIÓN GENERAL

El asma es una enfermedad con una fisiopatología compleja en la que intervienen varios factores. Uno de los hechos que caracteriza esta enfermedad es la hiperrespuesta bronquial (HRB), definida como el estrechamiento de la vía aérea, que se acompaña de síntomas como dificultad respiratoria, sibilantes o tos. Los hechos que subyacen a la HRB son fundamentalmente la inflamación bronquial y la remodelación de la vía aérea. Desde hace años se han utilizado diferentes estímulos para evidenciar la HRB mediante la provocación bronquial. Los estímulos directos producen broncoconstricción estimulando directamente la contracción del músculo liso de la vía aérea (88). Por el contrario, los estímulos indirectos actúan liberando mediadores de células intermediarias, como células inflamatorias, epiteliales o nervios (86,132). La adenosina (AMP) inhalada actúa a través de los receptores  $A_{2b}$  y como resultado produce broncoconstricción por degranulación de mastocitos que liberan histamina y otras citoquinas (118).

En la actualidad el diagnóstico de asma en la clínica habitual se basa fundamentalmente síntomas compatibles junto con la evidencia de HRB, que habitualmente se determina mediante test de broncodilatación o provocación bronquial inespecífica con agentes directos (metacolina), que valoran sólo uno de los componentes de la HRB.

Si bien, tan importante como la remodelación bronquial es la inflamación, que habitualmente se encuentra presente antes de que se produzcan los cambios estructurales bronquiales. En el asma existen varios tipos de inflamación: inflamación eosinofílica, inflamación neutrofílica y un tipo mixto con bajo recuento de células polimorfonucleares (paucigranulocítico). El fenotipo más habitual es la inflamación eosinofílica, especialmente en pacientes atendidos en consultas de alergología. Actualmente disponemos de diferentes abordajes para valorar la inflamación bronquial como son el recuento celular diferencial en esputo inducido, las provocaciones bronquiales inespecíficas con agentes indirectos (p.ej. adenosina, manitol) o la medición de FeNO. Estas dos últimas son técnicas mucho más asequibles para la práctica diaria habitual, puesto que consumen menos tiempo y recursos y se ha demostrado que los resultados de ambas se correlacionan con el número de eosinófilos en esputo, por lo que son buenos marcadores indirectos de la inflamación eosinofílica (109,234).

En el primer capítulo de esta tesis, se valora la utilidad de la provocación bronquial inespecífica con AMP en el diagnóstico de asma, usando como estándar de referencia la presencia de síntomas compatibles y un test de metacolina positivo.

En este trabajo se pone de manifiesto la utilidad de la provocación bronquial con AMP en el diagnóstico de asma. Se calculó el rendimiento diagnóstico de la prueba obteniendo una sensibilidad del 100%, especificidad del 90% y un elevado valor predictivo tanto positivo (88,9%)



como negativo (100%). Se trata, por tanto, de una prueba excelente tanto para descartar como para confirmar el diagnóstico de asma. Además, se obtuvo una correlación muy elevada entre los resultados de uno y otro test (índice Kappa=0,889;  $p<0,05$ ), siendo el resultado de ambas pruebas (positivo vs. negativo) superponible en un 94,4% de los casos. La provocación bronquial inespecífica con AMP es por tanto un test diagnóstico excelente ya que permite el diagnóstico o la exclusión de asma con una gran precisión y además nos aporta información acerca de la inflamación bronquial subyacente, hecho que no puede ser menospreciado en la valoración del paciente asmático. No obstante, la hiperrespuesta a diferentes agentes broncoconstrictores no se detecta invariablemente en los mismos pacientes ni tampoco identifica las mismas alteraciones en la vía aérea (235). En nuestro trabajo, tres pacientes en los que el test de metacolina fue negativo, tuvieron un resultado positivo en el test de AMP. En uno de los casos, la  $PC_{20}$  con AMP fue elevada ( $PC_{20}=236,47$  mg/mL), siendo el test positivo con la última concentración de adenosina. Puede que la discordancia entre ambos resultados, se deba a un punto de corte demasiado alto para considerar la prueba positiva. Se ha demostrado que el AMP es un agente broncoconstrictor menos potente que la metacolina. Trabajos previos han puesto de manifiesto que en el asma el AMP es entre 4-12 veces menos potente que la metacolina (236,237) y 20-25 veces menos potente en pacientes con rinitis alérgica (238,239).

Los otros dos pacientes en los que el resultado fue discordante tenían unos valores de PC<sub>20</sub> en un intervalo intermedio. Una posible explicación a este hecho es que ambas pruebas, adenosina y metacolina, no reflejan los mismos hechos fisiopatológicos subyacentes y estos pacientes en los que el AMP fue positivo puedan tener una inflamación bronquial en el momento de la realización de la prueba y no tengan, sin embargo, los cambios de remodelación que conducen a la obstrucción que revela la reactividad frente a metacolina (235,237,240). En este sentido, se ha evidenciado una correlación entre la respuesta a AMP y el recuento de eosinófilos en esputo inducido en pacientes con rinitis alérgica, que no se encontró con metacolina (238). Además se ha visto que la respuesta a AMP es más sensible que la metacolina para detectar variaciones en la carga alérgica (144,145,241), por lo que puede que en estos pacientes con resultado discordante, hubiese una exposición alérgica reciente o persistente. Esto puede estar apoyado por el hecho de que los pacientes con una prueba de HRB positiva mostraron una mayor frecuencia de sensibilización a epitelios frente a los que tuvieron la prueba negativa, siendo los epitelios de animales el único alérgeno perenne que tiene relevancia clínica en nuestro medio ya que por condiciones climatológicas ni ácaros ni hongos son clínicamente relevantes en la región.

Otra posible explicación a la discordancia entre los resultados de la PBI con AMP y con metacolina es que el AMP origina una respuesta en la vía aérea más periférica que la metacolina. Los receptores para ambos agentes

no están distribuidos de forma uniforme a lo largo de la vía aérea y, por lo tanto, se puede esperar que la localización de la broncoconstricción inducida por cada uno de ellos sea diferente. Estudios con mapeo autorradiográfico han mostrado que los receptores muscarínicos de metacolina se localizan en el músculo liso de toda la vía aérea pero con una mayor densidad en la vía aérea de mayor calibre (242,243). Por el contrario, la densidad de mastocitos a través de los cuales el AMP actúa para producir broncoconstricción, es mucho mayor en la vía aérea distal que en la proximal (244). En 2011 Michils et al. (245) pusieron de manifiesto con estudios de difusión de ventilación de diferentes gases, que el AMP induce una respuesta en la vía bronquial periférica que alcanza los bronquiolos terminales, mientras que la metacolina lo hace en una vía más proximal. Este hecho podría explicar las discrepancias en los resultados de ambas provocaciones en algunos pacientes y reflejar que los pacientes con respuesta a AMP pero no a metacolina tienen afectación de la vía aérea pequeña pero no de la vía más proximal.

En un trabajo posterior al nuestro, Manso et al. (246) obtuvieron resultados algo diferentes. En este caso evaluaron 79 pacientes con sospecha de asma y obtuvieron un porcentaje de acuerdo en el resultado de ambas pruebas del 45,45% (índice Kappa: 0,369). En su protocolo consideraron la PC<sub>15</sub> frente a AMP, en lugar de la PC<sub>20</sub> y practicaron la provocación mediante respiración a volumen corriente en lugar de con dosímetro. Estas diferencias en los métodos podrían explicar los diferentes resultados. En este trabajo además

analizaron los niveles de FeNO y de eosinófilos en esputo inducido, obteniendo mejor correlación de ambos parámetros en el grupo de pacientes con resultado positivo en la PBI con AMP que los que tuvieron positiva la PBI con metacolina.

Sin embargo, en una investigación con 120 niños con sospecha de asma se objetivó una concordancia entre los resultados de la PBI con AMP y con metacolina del 86,7% (247). Estos autores relacionaron la PC<sub>20</sub>-AMP con la presencia de atopía, y al grado de ésta. La PC<sub>20</sub>-AMP fue menor en los pacientes atópicos que en los no atópicos, y cuando clasificaron los pacientes de acuerdo con los valores de IgE total y con el número de pruebas cutáneas positivas vieron que estaban inversamente relacionadas, estableciendo que la HRB a AMP está correlacionada con el grado de atopía. Sin embargo esta correlación no se apreció con la PC<sub>20</sub> frente a metacolina (247,248).

Como se ha comentado previamente, la respuesta bronquial a AMP refleja una inflamación activa de la vía aérea, especialmente eosinofílica, mientras que los agonistas directos como la histamina o metacolina, investigan alteraciones estructurales y persistentes que inducen los procesos inflamatorios mantenidos. En algunos artículos previos (249) se ha visto que hasta un 7,7% de los pacientes a los que se les había excluido el diagnóstico de asma mediante test de metacolina, requirieron tratamiento debido a síntomas respiratorios sugestivos de asma en los seis meses posteriores sugiriendo que una falta de HRB frente a metacolina puede no

ser definitiva para excluir el diagnóstico. En la misma línea, en un trabajo previo en el que se habían incluido 120 sujetos en los que se diagnosticó o excluyó asma mediante test de metacolina, entre otros, se objetivó que 7 de los 16 pacientes que tuvieron una PB negativa con metacolina, en los meses posteriores tuvieron síntomas de asma acompañados de un patrón obstructivo en la espirometría, que mejoró tras la medicación antiasmática (250). Por este motivo, sería interesante determinar si estos pacientes con AMP positiva desarrollarán estadios más avanzados de la enfermedad en un futuro, presentando hiperrespuesta frente a metacolina. De acuerdo con estos hallazgos, no debería excluirse el diagnóstico de asma de forma tajante ante una clínica sugestiva y un test de metacolina negativo, puesto que la inflamación bronquial es un hecho determinante de la fisiopatología del asma y, por lo tanto, podría tratarse de un "estadio previo" de la enfermedad, que con el tiempo llegue a desarrollar los cambios en la remodelación que conducen a la reducción del calibre de la vía aérea.

Otra forma de valorar la inflamación bronquial de manera no invasiva es la determinación de NO en aire exhalado. Se ha descrito la asociación de los niveles de NO elevados con la presencia de inflamación eosinofílica en la vía aérea y hay varios estudios que correlacionan los niveles de FeNO con la detección de eosinófilos en lavado broncoalveolar (206), en biopsia bronquial (251) y en esputo inducido, estableciéndose en este último caso, puntos de corte entre 21-36 ppb para predecir eosinofilia >3% en esputo (208,210,252,253), que es la considerada clínicamente relevante. Los

niveles de FeNO además están asociados con el resultado de la PB con estímulos indirectos más que con estímulos directos, como es lógico, puesto que ambos parámetros son indicadores indirectos de inflamación bronquial (109,140,254).

En pacientes con síntomas sugestivos de asma, como tos, disnea o sibilantes, un valor de FeNO elevado apoya el diagnóstico, si bien, un valor bajo no lo excluye, especialmente en pacientes no atópicos (255). En algunos trabajos, los valores de FeNO se han mostrado más específicos que el pico flujo o que la espirometría (212,256) y similares a las pruebas de provocación (214). Sin embargo estas investigaciones son heterogéneas tanto en la técnica de medición de FeNO, como en la herramienta utilizada para determinar que el paciente tiene asma. Por este motivo se planteó el estudio llevado a cabo en el capítulo 2 de esta tesis.

En este trabajo se investigó el valor diagnóstico del FeNO en pacientes con sospecha de asma a los que se hizo un test de PBI con metacolina como parte del protocolo de diagnóstico. Encontramos unos valores de FeNO significativamente más altos en aquellos pacientes con un test de metacolina positivo, frente a aquellos que tuvieron un resultado negativo en la prueba (media: 58 ppb; IQR: 36-112, vs. media: 29,5 ppb; IQR: 21-42,75;  $p=0.000$ ). Ambos grupos de análisis eran comparables en la distribución de variables que son conocidas como posibles factores que afectan a la medición de FeNO como el sexo, el índice de masa corporal, el hábito tabáquico, la presencia de rinitis y el tratamiento habitual para el asma

previo a la prueba. Sólo hubo diferencias en cuanto al porcentaje de pacientes atópicos que fue mayor en aquellos que tuvieron una prueba de metacolina positiva (97,1% vs. 82,5%,  $p=.036$ ), y esto fue así a expensas de la sensibilización a epitelios (48,6% vs. 22,5%,  $p=.008$ ). Una explicación posible a este hecho es que en nuestro medio, como se ha comentado previamente, los únicos alérgenos perennes con relevancia clínica son los epitelios. La exposición constante a los mismos a lo largo de todo el año hace que estos pacientes tengan una inflamación subyacente de forma persistente y, por lo tanto, también un mayor grado de hiperreactividad bronquial que otros pacientes sensibilizados a alérgenos estacionales a los que no se encuentran expuestos a lo largo de todo el año.

En nuestra población se obtuvo una prevalencia de asma del 30,4%. Con los datos de FeNO obtenidos se contruyó una curva ROC para establecer la rentabilidad diagnóstica de la prueba, obteniéndose un buen área bajo la curva (AUC: 0,762; 95%CI: 0,667-0,857;  $p=.000$ ). Se calculó el punto de corte de FeNO con máxima sensibilidad (74,3%) y especificidad (72,5%) resultando un valor de 40 ppb. Con este punto de corte, el 41,7% de los pacientes tuvo niveles de FeNO elevados, por lo que el porcentaje de pacientes con resultado concordante en la prueba de metacolina y el FeNO fue del 73%. No obstante el índice Kappa mostró una correlación moderada (0,423).

Con el punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad, el VPP obtenido no es alto (54,2%), sin embargo sí tiene un elevado VPN (86,6%),

lo que lleva a afirmar que ante síntomas sugestivos de asma en una población atópica, un valor de FeNO por debajo de 40 ppb permite excluir el diagnóstico de asma con una elevada probabilidad. Considerando este hecho se propone incluir la determinación de FeNO en el árbol de decisión de diagnóstico de asma como un paso previo a las pruebas de provocación bronquial inespecífica, ya que evitaría la realización de buena parte de las mismas, que aunque controladas, no están exentas de riesgo y suponen un consumo de recursos que podría evitarse.

Trabajos posteriores (257–262) al nuestro han revelado hallazgos similares, aunque con diferentes puntos de corte, debido a las diferencias en el diseño y la población de estudio. Fukuhara et al. (260) evaluaron 97 pacientes con sospecha de asma. Empleando un punto de corte de FeNO de 40 ppb obtuvieron una sensibilidad de 78,6% (95% CI, 0,71%-0,82%), especificidad de 89,5% (95% CI, 0,73%-0,97%), una razón de probabilidad positiva de 7,46 (95% CI, 2,61–26,56), y una razón de probabilidad negativa de 0,24 (95 CI, 0,19–0,40). La concordancia entre diagnosticar asma por medio de test convencionales y a través de los valores de FeNO fue de 0,62. Cordeiro et al. (261) valoraron un grupo de 114 pacientes con sospecha de asma que no tenían tratamiento con corticosteroides inhalados y obtuvieron un punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad para el FeNO de 27 ppb. Con este valor consiguen una sensibilidad del 78%, especificidad del 92%, VPP del 86% y VPN de 87%. Woo et al. (263) en un trabajo similar con 245 niños con sospecha de asma a los que practican test



de broncodilatación o metacolina para establecer el diagnóstico, obteniendo un punto de corte de 22 ppb con máximo valor de sensibilidad y especificidad (56,9% y 87,2%, respectivamente) con un VPP de 90,%% y NPV de 48,6%. Posteriormente Schneider et al. (264) alcanzaron una sensibilidad de 49% y especificidad de 75% con VPP: 56% y VPN: 69% para un valor de FeNO de 25 ppb y Voutilainen et al. (262) resultados similares con un punto de corte de 22 ppb (S: 56%, E: 70%, VPP: 75%, VPN: 49%). Por último, Florentin et al. (259) en un estudio diseñado para el diagnóstico de asma ocupacional propusieron un FeNO de 25 ppb como punto de corte con una S: 42%, E: 92%, VPP: 40% y VPN: 93%. La mayoría de los trabajos coinciden en unos valores predictivos negativos elevados y no tan buen valor predictivo positivo, lo que implica que la medición de FeNO es una herramienta que sirve más para la exclusión del diagnóstico de asma que para confirmarlo. A este respecto se ha publicado recientemente un metaanálisis de varios trabajos que estimaron el papel del FeNO en el diagnóstico de asma, entre los que se incluyó nuestro artículo objeto del segundo capítulo de esta tesis (265). Se consideraron en este metaanálisis 4691 pacientes en los que se determinó el FeNO y se calcularon variables de rendimiento diagnóstico. Los resultados del análisis conjunto de los estudios mostraron una sensibilidad del 78%, especificidad del 74%. Igualmente calcularon la razón de probabilidad positiva obteniendo un resultado de 3,70. Esto implica que un paciente con asma tiene casi cuatro veces más probabilidad de tener un resultado elevado de FeNO que un

paciente sin la enfermedad. De la misma forma se calculó la razón de probabilidad negativa siendo el resultado de 0,35. Esto significa que la probabilidad de que un paciente con asma tenga un valor bajo de FeNO es del 35%. Por lo tanto, estos autores (265) concluyeron que el FeNO no es una herramienta diagnóstica útil para ser utilizada de forma aislada en el diagnóstico de asma, aunque sí es una medida complementaria a los test de función pulmonar y la prueba broncodilatadora.

Aunque una determinación de FeNO elevada no es diagnóstica *per se* de asma, sí es conveniente determinar este marcador de inflamación bronquial y valorarlo conjuntamente con los parámetros de función pulmonar y los síntomas clínicos. La importancia del FeNO en el diagnóstico del asma se ha recogido en la última versión de la guía española para el manejo del asma (GEMA 4.0) (2) y el punto de corte para considerar un FeNO elevado se ha actualizado según las recomendaciones de la ATS y se ha situado en 50 ppb (87). No obstante, un metaanálisis posterior de valores de FeNO en población sana, ha sugerido que este punto de corte debería bajarse a 39 ppb (266). Del mismo modo, la Sociedad de Neumología Francesa, ha publicado recientemente sus recomendaciones acerca de la medición de NO en el asma (267), incluyéndolo tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de pacientes.

La determinación de FeNO es conveniente no sólo por la pertinencia de valorar el componente inflamatorio como parte del diagnóstico sino porque, además, la valoración de la inflamación bronquial tiene también

implicaciones terapéuticas. En el asma existen varios tipos de inflamación y el más habitual es la inflamación eosinofílica. Este tipo de inflamación tiene característicamente niveles elevados de FeNO como marcador indirecto de la presencia de eosinófilos en el epitelio bronquial (207) y, por tanto, es sensible al tratamiento con corticosteroides (268). Además, recientemente se ha demostrado que el valor de FeNO puede ayudar también a fenotipar a aquellos pacientes que responden bien al tratamiento con anticuerpos monoclonales antiIgE (omalizumab) (269). Por todo ello, la medición del FeNO tiene implicaciones a nivel terapéutico que no se pueden obviar.

En el tercer capítulo de esta tesis se investiga la utilidad de la determinación de FeNO tras la provocación bronquial específica (PBE) con alérgeno como marcador de inflamación bronquial en pacientes con asma alérgica.

La PBE se ha empleado en la investigación de la patogenia del asma o en el diagnóstico de asma ocupacional, dadas las implicaciones médico-legales que tiene.

Además de la respuesta inmediata tras la PBE, la inhalación del alérgeno puede inducir una respuesta tardía caracterizada por la infiltración de eosinófilos activados (270), lo que se asocia con un incremento en la hiperrespuesta bronquial (271). Este incremento del FeNO en asmáticos tras la PBE se ha relacionado con un aumento de la inmunorreactividad de la sintasa inducible de NO (iNOS) en el epitelio bronquial (272).

En nuestro trabajo se investigó la utilidad del FeNO en 34 pacientes a los que se realizó PBE con alérgeno. Se obtuvieron determinaciones basales de

FeNO el día de la PBE, previo a la práctica de la misma, y posteriormente al cabo de 24 horas de la finalización. La PBE fue positiva en 21 pacientes (61,8%). No hubo diferencias en los valores de FeNO basal entre aquellos pacientes en lo que el resultado de la PBE fue positivo, frente a los que tuvieron un resultado negativo. La respuesta tras PBE fue inmediata en siete pacientes, tardía en tres pacientes y dual en once pacientes.

La mediana del incremento de FeNO en los pacientes con PBE positiva fue de 14 ppb (IQR: 7 - 37), y fue significativamente mayor que en los pacientes en que tuvieron una PBE negativa (mediana: -1 ppb, IQR: -8 - 5) ( $p < 0.001$ ). Cuando se analizó este incremento en función del tipo de respuesta (inmediata aislada vs. dual o tardía) no hubo diferencias significativas. Estos hallazgos son similares a estudios previos en los que no se encontró diferencia en el porcentaje de eosinófilos en esputo en pacientes con respuesta inmediata aislada y aquellos con respuesta dual tras la PBE (221,273).

Además, se investigó si el aumento de FeNO tenía relación con el valor de FeNO basal, no encontrando, tampoco, diferencias significativas.

Con los valores de FeNO se construyó una curva ROC para buscar un punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad en el incremento de FeNO entre el valor basal y el determinado tras 24 horas post-PBE. Se obtuvo un valor de incremento de FeNO del 12% que se asocia con un resultado positivo en la PBE con una sensibilidad del 81%, una especificidad del 90%, VPP de 94,44% y VPN de 75%. Esto demuestra que la determinación de

FeNO tras 24 horas post-PBE es un buen reflejo de los cambios inflamatorios que se asocian con una respuesta positiva en la prueba de provocación.

Trabajos posteriores han encontrado resultados similares. Sastre et al. (274) analizaron 68 pacientes con sospecha de asma ocupacional a los que realizaron PBE con agentes de alto y bajo peso molecular. Encontraron que un incremento de FeNO del 25% en el grupo de pacientes con PBE positiva. El punto de corte con máxima sensibilidad (50%) y especificidad (95%) para precedir una PBE positiva fue un incremento de 41% con respecto al basal. En su investigación, sólo los agentes de bajo peso molecular indujeron un cambio significativo en el FeNO. Sin embargo, trabajos posteriores con agentes de bajo peso molecular no han encontrado cambios en el FeNO tras la PBE (275), que los autores atribuyen al hecho de que el infiltrado inflamatorio en el asma ocupacional por agentes de bajo peso molecular es predominantemente neutrofílico y no eosinofílico, que es el que tiene niveles elevados de FeNO. En nuestro caso, las provocaciones se efectuaron con agentes de alto peso molecular, lo que puede explicar las discrepancias con estos últimos resultados. En línea con nuestros hallazgos, Lemiere et al. (276) analizaron los cambios de FeNO en 178 pacientes con sospecha de asma ocupacional y detectaron que el incremento de FeNO fue mayor en aquellos pacientes con un resultado positivo tras la PBE con un agente de alto peso molecular ( $28,8 \pm 27,1$  ppb) frente a aquellos expuestos a agentes de bajo peso molecular ( $9,5 \pm 18,4$  ppb;  $p=0.001$ ). Esta asociación entre el

incremento de FeNO y la exposición a agentes de alto peso molecular puede deberse al mecanismo mediado por IgE subyacente más que al tipo de agente en sí mismo. Estos autores (276) recomiendan el uso de FeNO como marcador indirecto de inflamación en la vía aérea tras la PBE con agentes de alto peso molecular, sobre todo en pacientes en los que no es posible obtener una muestra de esputo inducido, lo que ocurrió hasta en un 37% de los pacientes.

Los resultados de nuestro trabajo subrayan la importancia de la valoración del componente inflamatorio tras la PBE. Un incremento del FeNO 24 horas tras PBE por encima del 12% ha demostrado un buen rendimiento diagnóstico, ayudando a la interpretación de los resultados obtenidos tras PBE con alérgeno. Así, algunos autores (277) han recalcado la importancia de la determinación de la inflamación bronquial mediante métodos no invasivos en situaciones de patología respiratoria ocupacional. Más recientemente, en el documento de consenso de la Sociedad Respiratoria Europea (ERS) de 2014 (278) se recoge la importancia del FeNO en la evaluación de la respuesta a la PBE con alérgeno, estableciendo que el incremento de FeNO 24 horas post-PBE puede apoyar la respuesta positiva en los casos en los que los cambios en el FEV<sub>1</sub> no sean concluyentes.

## CONCLUSIONES





## CONCLUSIONES

- El asma es una enfermedad multifactorial y con diferentes fenotipos, por lo que no se puede valorar en el diagnóstico únicamente un aspecto aislado como la hiperrespuesta bronquial, sino que se debe considerar una valoración conjunta con marcadores inflamatorios, tanto en el diagnóstico como en la evaluación de la actividad de la enfermedad.
- La provocación bronquial inespecífica con agentes indirectos, en este caso adenosina, es una forma de analizar el componente inflamatorio del asma, que en esta tesis se ha demostrado que tiene una buena correlación con los resultados del test de metacolina, por lo que es una herramienta útil para el diagnóstico del asma. Si bien en la práctica clínica habitual no muestra ventajas sobre la provocación bronquial inespecífica con metacolina ya que la concordancia de los resultados con ambas técnicas es muy elevada, sí debe plantearse su uso en aquellos pacientes con elevada sospecha clínica de asma en los que el test de metacolina resulta negativo.
- En la actualidad la medición de óxido nítrico en aire exhalado es el mejor biomarcador no invasivo disponible para la valoración del componente inflamatorio en el asma. Aunque no puede emplearse de forma aislada para el diagnóstico, la determinación de óxido nítrico en aire exhalado ayuda en el diagnóstico. Una determinación

de óxido nítrico en aire exhalado por debajo de 40 ppb permite excluir el diagnóstico de asma, considerado conjuntamente con las medidas de función pulmonar.

- Además el óxido nítrico en aire exhalado evaluado 24 horas tras la provocación bronquial específica con alérgeno tiene buena capacidad diagnóstica cuando se utiliza en la valoración de los resultados de la provocación, por lo que se debe considerar su empleo para analizar el componente inflamatorio del asma, sobre todo en los casos en los que no es posible lograr la obtención de muestras de esputo inducido.

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Global strategy for asthma management and prevention (GINA) 2014. 2014.
2. GEMA 4.0. Guía española para el manejo del asma. Arch Bronconeumol. 2015;51:1-58.
3. Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. Am Rev Respir Dis. 1990;142:1351-8.
4. Hopp RJ, Bewtra AK, Biven R, Nair NM, Townley RG. Bronchial reactivity pattern in nonasthmatic parents of asthmatics. Ann Allergy. 1988;61:184-6.
5. Clarke JR, Jenkins MA, Hopper JL, Carlin JB, Mayne C, Clayton DG, et al. Evidence for genetic associations between asthma, atopy, and bronchial hyperresponsiveness: a study of 8- to 18-yr-old twins. Am J Respir Crit Care Med. 2000;162:2188-93.
6. Moffatt M, Gut I, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A Large-Scale, Consortium-Based Genomewide Association Study of Asthma. N Engl J Med. 2010;363:1211-21.
7. Postma DS, Bleeker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI, et al. Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. N Engl J Med. 1995;333:894-900.
8. Ruffilli A, Bonini S. Susceptibility genes for allergy and asthma. Allergy. 1997;52:256-73.
9. Meyers DA, Postma DS, Stine OC, Koppelman GH, Ampleford EJ, Jongepier H, et al. Genome screen for asthma and bronchial hyperresponsiveness: interactions with passive smoke exposure. J Allergy Clin Immunol. 2005;115:1169-75.
10. Colilla S, Nicolae D, Pluzhnikov A, Blumenthal MN, Beaty TH, Bleeker ER, et al. Evidence for gene-environment interactions in a linkage study of asthma and smoking exposure. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:840-6.
11. Brand S, Kesper DA, Teich R, Kilic-Niebergall E, Pinkenburg O, Bothur E, et al. DNA methylation of TH1/TH2 cytokine genes affects

sensitization and progress of experimental asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:1602–10.

12. Szabo SM, Levy AR, Gooch KL, Bradt P, Wijaya H, Mitchell I. Elevated risk of asthma after hospitalization for respiratory syncytial virus infection in infancy. *Paediatr Respir Rev.* 2013;13:S9–15.
13. Ege MJ, Mayer M, Normand A-C, Genuneit J, Cookson WOCM, Braun-Fahrlander C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med.* 2011;364:701–9.
14. Custovic A, Rothers J, Stern D, Simpson A, Woodcock A, Wright AL, et al. Effect of day care attendance on sensitization and atopic wheezing differs by Toll-like receptor 2 genotype in 2 population-based birth cohort studies. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:390–7.
15. Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory Mediators of Asthma : An Update. *Pharmacol Rev.* 1998;50:515–96.
16. John M, Hirst SJ, Jose PJ, Robichaud A, Berkman N, Witt C, et al. Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to T helper 1 cytokines: regulation by T helper 2 cytokines and corticosteroids. *J Immunol.* 1997;158:1841–7.
17. Saunders MA, Mitchell JA, Seldon PM, Yacoub MH, Barnes PJ, Giembycz MA, et al. Release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor by human cultured airway smooth muscle cells: suppression by dexamethasone. *Br J Pharmacol.* 1997;120:545–6.
18. Levine SJ. Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. *J Investig Med.* 1995;43:241–9.
19. Colgan JD, Hankel IL. Signaling pathways critical for allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010;10:42–7.
20. Salazar F, Ghaemmaghami AM. Allergen recognition by innate immune cells: critical role of dendritic and epithelial cells. *Front Immunol.* 2013;4:356.
21. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med.* 2012;18:684–92.

22. Pichavant M, Charbonnier A-S, Taront S, Brichet A, Wallaert B, Pestel J, et al. Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:771–8.
23. Kallal LE, Schaller MA, Lindell DM, Lira SA, Lukacs NW. CCL20/CCR6 blockade enhances immunity to RSV by impairing recruitment of DC. *Eur J Immunol.* 2010;40:1042–52.
24. Lambrecht BN, Hammad H. Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:243–70.
25. Hammad H, Lambrecht BN. Lung dendritic cell migration. *Adv Immunol.* 2007;93:265–78.
26. Otero K, Vecchi A, Hirsch E, Kearley J, Vermi W, Del Prete A, et al. Nonredundant role of CCRL2 in lung dendritic cell trafficking. *Blood.* 2010;116:2942–9.
27. Maazi H, Lam J, Lombardi V, Akbari O. Role of plasmacytoid dendritic cell subsets in allergic asthma. *Allergy.* 2013;68:695–701.
28. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 1992;326:298–304.
29. Oh CK, Geba GP, Molino N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. *Eur Respir Rev.* 2010;19:46–54.
30. Mullings RE, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL, Bucchieri F, Djukanović R, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108:832–8.
31. Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH, et al. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:215–22.

32. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007;96:41–101.
33. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy.* 2011;66:989–98.
34. Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Free ME, Kolls JK, Cook DN. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:720–30.
35. Lloyd CM, Saglani S. T cells in asthma: influences of genetics, environment, and T-cell plasticity. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:1267–74.
36. O’Hehir RE, Gardner LM, de Leon MP, Hales BJ, Biondo M, Douglass JA, et al. House dust mite sublingual immunotherapy: the role for transforming growth factor-beta and functional regulatory T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:936–47.
37. Umetsu DT, Akbari O, Dekruyff RH. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:480–7.
38. Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998;115:257–69.
39. Saenz SA, Siracusa MC, Perrigoue JG, Spencer SP, Urban JF, Tocker JE, et al. IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses. *Nature.* 2010;464:1362–6.
40. Her E, Frazer J, Austen KF, Owen WF. Eosinophil hematopoietins antagonize the programmed cell death of eosinophils. Cytokine and glucocorticoid effects on eosinophils maintained by endothelial cell-conditioned medium. *J Clin Invest.* 1991;88:1982–7.
41. Fulkerson PC, Rothenberg ME. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:117–29.
42. Lantero S, Spallarossa D, Silvestri M, Sabatini F, Scarso L, Crimi E, et al. In allergic asthma experimental exposure to allergens is



associated with depletion of blood eosinophils overexpressing LFA-1. *Allergy*. 2002;57:1036–43.

43. Zimmermann N, McBride ML, Yamada Y, Hudson SA, Jones C, Cromie KD, et al. Siglec-F antibody administration to mice selectively reduces blood and tissue eosinophils. *Allergy*. 2008;63:1156–63.
44. Nutku E, Aizawa H, Hudson SA, Bochner BS. Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis. *Blood*. 2003;101:5014–20.
45. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:709–50.
46. Kita H. Eosinophils: multifunctional and distinctive properties. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161:S3–9.
47. De Andres B, del Pozo V, Martin E, Palomino P, Lahoz C. Release of O<sub>2</sub>- and LTC<sub>4</sub> by murine eosinophils: role of intra- and extracellular calcium. *Immunology*. 1990;69:271–6.
48. Del Pozo V, de Arruda-Chaves E, de Andrés B, Cárdena B, López-Farré A, Gallardo S, et al. Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J Immunol*. 1997;158:859–64.
49. Bochner BS. Verdict in the case of therapies versus eosinophils: the jury is still out. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:3–9.
50. Lacy P, Weller PF, Moqbel R. A report from the International Eosinophil Society: eosinophils in a tug of war. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:895–900.
51. Reber L, Da Silva CA, Frossard N. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol*. 2006;533:327–40.
52. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol Rev*. 2011;242:31–50.

53. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1532–9.
54. Kato T, Takeda Y, Nakada T, Sendo F. Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. *Nat Immun*. 1995;14:198–208.
55. Ordoñez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy J V. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1185–90.
56. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012;18:716–25.
57. Busse WW. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. 2010;138:4S – 10S.
58. O’Byrne PM, Gauvreau GM, Brannan JD. Provoked models of asthma: what have we learnt? *Clin Exp Allergy*. 2009;39:181–92.
59. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:551–9.
60. Covar RA. Bronchoprovocation testing in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27:633–49.
61. Gibson PG, Saltos N, Borgas T. Airway mast cells and eosinophils correlate with clinical severity and airway hyperresponsiveness in corticosteroid-treated asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:752–9.
62. Kariyawasam HH, Aizen M, Barkans J, Robinson DS, Kay AB. Remodeling and airway hyperresponsiveness but not cellular inflammation persist after allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:896–904.
63. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:S28–38.

64. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1720–45.
65. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins J V, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140:1745–53.
66. Montefort S, Roche WR, Holgate ST. Bronchial epithelial shedding in asthmatics and non-asthmatics. *Respir Med*. 1993;87 Suppl B:9–11.
67. Xiao C, Puddicombe SM, Field S, Haywood J, Broughton-Head V, Puxeddu I, et al. Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128:549–56.
68. Erjefält JS, Persson CG. Airway epithelial repair: breathtakingly quick and multipotentially pathogenic. *Thorax*. 1997;52:1010–2.
69. Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:193–204.
70. Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, Krishna MT, Howarth PH, Holgate ST, et al. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J*. 2000;14:1362–74.
71. Gizycki MJ, Adelroth E, Rogers A V, O'Byrne PM, Jeffery PK. Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;16:664–73.
72. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;3:507–11.
73. Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, Regamey N, Frith J, Oates T, et al. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without T(H)2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:974–82.
74. Sonnappa S, Bastardo CM, Saglani S, Bush A, Aurora P. Relationship between past airway pathology and current lung function in preschool wheezers. *Eur Respir J*. 2011;38:1431–6.

75. Gelb AF, Zamel N. Unsuspected pseudophysiologic emphysema in chronic persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1778–82.
76. Grainge CL, Lau LCK, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med*. 2011;364:2006–15.
77. Doeing DC, Solway J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J Appl Physiol*. 2013;114:834–43.
78. Hirst SJ, Barnes PJ, Twort CH. PDGF isoform-induced proliferation and receptor expression in human cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1996;270:L415–28.
79. Cohen P, Rajah R, Rosenbloom J, Herrick DJ. IGFBP-3 mediates TGF-beta1-induced cell growth in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278:L545–51.
80. Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med*. 1997;186:1737–47.
81. Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, et al. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med*. 1997;185:2143–56.
82. Tyner JW, Kim EY, Ide K, Pelletier MR, Roswit WT, Morton JD, et al. Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals. *J Clin Invest*. 2006;116:309–21.
83. Patel AC, Brett TJ, Holtzman MJ. The role of CLCA proteins in inflammatory airway disease. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:425–49.
84. GEMA 2009. Guía española para el manejo del asma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20:1–59.
85. Fruchter O, Hardak E, Yigla M. The response to bronchodilators in adults is not predictive of bronchial-hyperreactivity. *J Asthma*. 2009;46:455–9.

86. Joos GF, O'Connor BJ, Anderson SD, Chung F, Cockcroft DW, Dahlén B, et al. Indirect airway challenges. *Eur Respir J*. 2003;21:1050–68.
87. Dweik R, Boggs P, Erzurum S, Irvin C. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:602–15.
88. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O'Byrne PM, Anderson SD, et al. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. *Eur Respir J*. 1993;6:53–83.
89. Pauwels R, Joos G, Van der Straeten M. Bronchial hyperresponsiveness is not bronchial hyperresponsiveness is not bronchial asthma. *Clin Allergy*. 1988;18:317–21.
90. Chatham M, Bleecker ER, Norman P, Smith PL, Mason P. A screening test for airways reactivity. An abbreviated methacholine inhalation challenge. *Chest*. 1982;82:15–8.
91. Townley RJ, Hopp RJ. Inhalation methods for the study of airway responsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 1987;80:111–24.
92. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:309–29.
93. Juniper EF, Frith PA, Dunnett C, Cockcroft DW, Hargreave FE. Reproducibility and comparison of responses to inhaled histamine and methacholine. *Thorax*. 1978;33:705–10.
94. Seppälä OP. Reproducibility of methacholine induced bronchoconstriction in healthy subjects: the use of area under the expiratory flow-volume curve to express results. *Respir Med*. 1990;84:387–94.
95. Sherman CB, Kern DG, Corwin RW, Andrus B. A clinical and structural comparison of industrial methacholine and provochole. *Chest*. 1994;105:1095–7.

96. Perpiñá M, Pellicer C, de Diego A, Compte L, Macián V. Diagnostic value of the bronchial provocation test with methacholine in asthma. A Bayesian analysis approach. *Chest*. 1993;104:149–54.
97. Perpiñá Tordera M, García Río F, Alvarez Gutierrez FJ, Cisneros Serrano C, Compte Torrero L, Entrenas Costa LM, et al. Guidelines for the Study of Nonspecific Bronchial Hyperresponsiveness in Asthma. *Arch Bronconeumol*. 2013;49:432–46.
98. Cockcroft DW, Killian DN, Mellon JJ, Hargreave FE. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin Allergy*. 1977;7:235–43.
99. Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, McLean JA, Rosenthal RR, et al. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol*. 1975;56:323–7.
100. Ryan G, Dolovich MB, Roberts RS, Frith PA, Juniper EF, Hargreave FE, et al. Standardization of inhalation provocation tests: two techniques of aerosol generation and inhalation compared. *Am Rev Respir Dis*. 1981;123:195–9.
101. Chinn S, Burney P, Jarvis D, Luczynska C. Variation in bronchial responsiveness in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J*. 1997;10:2495–501.
102. Schulze J, Rosewich M, Riemer C, Dressler M, Rose MA, Zielen S. Methacholine challenge--comparison of an ATS protocol to a new rapid single concentration technique. *Respir Med*. 2009;103:1898–903.
103. Todd DC, Davis BE, Hurst TS, Cockcroft DW. Dosimeter methacholine challenge: comparison of maximal versus submaximal inhalations. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:517–9.
104. Allen ND, Davis BE, Hurst TS, Cockcroft DW. Difference between dosimeter and tidal breathing methacholine challenge: contributions of dose and deep inspiration bronchoprotection. *Chest*. 2005;128:4018–23.
105. Cockcroft DW, Davis BE, Todd DC, Smycniuk AJ. Methacholine challenge: comparison of two methods. *Chest*. 2005;127:839–44.

106. Cockcroft DW, Murdock KY, Berscheid BA, Gore BP. Sensitivity and specificity of histamine PC20 determination in a random selection of young college students. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;89:23–30.
107. Cockcroft DW, Murdock KY, Mink JT. Determination of histamine PC20. Comparison of linear and logarithmic interpolation. *Chest.* 1983;84:505–6.
108. Merget R, Jörres RA, Heinze E, Haufs MG, Taeger D, Brüning T. Development of a 1-concentration-4-step dosimeter protocol for methacholine testing. *Respir Med.* 2009;103:607–13.
109. Van Den Berge M, Meijer RJ, Kerstjens HA, de Reus DM, Koëter GH, Kauffman HF, et al. PC(20) adenosine 5'-monophosphate is more closely associated with airway inflammation in asthma than PC(20) methacholine. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1546–50.
110. Lopez V, Prieto L, Perez C, Barato D, Marin J. Effects of allergen exposure on methacholine and AMP-induced air trapping in pollen-sensitive subjects. *Respir Med.* 2011;105:856–63.
111. Allen ND, Davis BE, Cockcroft DW. Correlation between airway inflammation and loss of deep-inhalation bronchoprotection in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008 Oct;101:413–8.
112. Anderson SD. Indirect challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest.* 2010;138:25S – 30S.
113. Spicuzza L, Di Maria G, Polosa R. Adenosine in the airways: implications and applications. *Eur J Pharmacol.* 2006;533:77–88.
114. Rose FR, Hirschhorn R, Weissmann G, Cronstein BN. Adenosine promotes neutrophil chemotaxis. *J Exp Med.* 1988;167:1186–94.
115. Church MK, Holgate ST, Hughes PJ. Adenosine inhibits and potentiates IgE-dependent histamine release from human basophils by an A2-receptor mediated mechanism. *Br J Pharmacol.* 1983;80:719–26.
116. Peachell PT, Columbo M, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Marone G. Adenosine potentiates mediator release from human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis.* 1988;138:1143–51.

117. Feoktistov I, Biaggioni I. Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J Clin Invest.* 1995;96:1979–86.
118. Polosa R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2002;20:488–96.
119. Cushley MJ, Tattersfield AE, Holgate ST. Inhaled adenosine and guanosine on airway resistance in normal and asthmatic subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 1983;15:161–5.
120. Phillips GD, Scott VL, Richards R, Holgate ST. Effect of nedocromil sodium and sodium cromoglycate against bronchoconstriction induced by inhaled adenosine 5'-monophosphate. *Eur Respir J.* 1989;2:210–7.
121. Crimi N, Palermo F, Oliveri R, Vancheri C, Polosa R, Palermo B, et al. Comparative study of the effects of nedocromil sodium (4 mg) and sodium cromoglycate (10 mg) on adenosine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Clin Allergy.* 1988;18:367–74.
122. Richards R, Phillips GD, Holgate ST. Nedocromil sodium is more potent than sodium cromoglycate against AMP-induced bronchoconstriction in atopic asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy.* 1989;19:285–91.
123. Rorke S, Jennison S, Jeffs JA, Sampson AP, Arshad H, Holgate ST. Role of cysteinyl leukotrienes in adenosine 5'-monophosphate induced bronchoconstriction in asthma. *Thorax.* 2002;57:323–7.
124. Rafferty P, Beasley R, Holgate ST. The contribution of histamine to immediate bronchoconstriction provoked by inhaled allergen and adenosine 5' monophosphate in atopic asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1987;136:369–73.
125. Björck T, Gustafsson LE, Dahlén SE. Isolated bronchi from asthmatics are hyperresponsive to adenosine, which apparently acts indirectly by liberation of leukotrienes and histamine. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145:1087–91.



126. Van Schoor J, Joos GF, Kips JC, Drajesk JF, Carpentier PJ, Pauwels RA. The effect of ABT-761, a novel 5-lipoxygenase inhibitor, on exercise- and adenosine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:875–80.
127. O'Connor BJ, Ridge SM, Barnes PJ, Fuller RW. Greater effect of inhaled budesonide on adenosine 5'-monophosphate-induced than on sodium-metabisulfite-induced bronchoconstriction in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146:560–4.
128. Doull I J, Sandall D, Smith S, Schreiber J, Freezer NJ, Holgate ST. Differential inhibitory effect of regular inhaled corticosteroid on airway responsiveness to adenosine 5' monophosphate, methacholine, and bradykinin in symptomatic children with recurrent wheeze. *Pediatr Pulmonol*. 1997;23:404–11.
129. Polosa R, Phillips GD, Rajakulasingam K, Holgate ST. The effect of inhaled ipratropium bromide alone and in combination with oral terfenadine on bronchoconstriction provoked by adenosine 5'-monophosphate and histamine in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;87:939–47.
130. Brown RA, Spina D, Page CP. Adenosine receptors and asthma. *Br J Pharmacol*. 2008;153:S446–56.
131. Crimi N, Palermo F, Oliveri R, Polosa R, Settinieri I, Mistretta A. Protective effects of inhaled ipratropium bromide on bronchoconstriction induced by adenosine and methacholine in asthma. *Eur Respir J*. 1992;5:560–5.
132. Van Schoor J, Joos GF, Pauwels RA. Indirect bronchial hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, pharmacology and implications for clinical research. *Eur Respir J*. 2000;16:514–33.
133. Cockcroft D, Davis B. Direct and indirect challenges in the clinical assessment of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2009;103:363–9.
134. Polosa R, Holgate ST. Adenosine bronchoprovocation: a promising marker of allergic inflammation in asthma? *Thorax*. 1997;52:919–23.
135. Anderson SD, Brannan JD, Spring J, Spalding N, Rodwell LT, Chan HK, et al. A new method for bronchial-provocation testing in asthmatic

- subjects using a dry powder of mannitol. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:758-65.
136. Koskela HO, Hyvärinen L, Brannan JD, Chan H-KK, Anderson SD. Responsiveness to three bronchial provocation tests in patients with asthma. *Chest*. 2003;124:2171-7.
  137. Anderton RC, Cuff MT, Frith PA, Cockcroft DW, Morse JL, Jones NL, et al. Bronchial responsiveness to inhaled histamine and exercise. *J Allergy Clin Immunol*. 1979;63:315-20.
  138. Eggleston PA. A comparison of the asthmatic response to methacholine and exercise. *J Allergy Clin Immunol*. 1979;63:104-10.
  139. Smith CM, Anderson SD. Inhalational challenge using hypertonic saline in asthmatic subjects: a comparison with responses to hyperpnoea, methacholine and water. *Eur Respir J*. 1990;3:144-51.
  140. Porsbjerg C, Rasmussen L, Thomsen SF, Brannan JD, Anderson SD, Backer V. Response to mannitol in asymptomatic subjects with airway hyper-responsiveness to methacholine. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:22-8.
  141. Ramsdale EH, Roberts RS, Morris MM, Hargreave FE. Differences in responsiveness to hyperventilation and methacholine in asthma and chronic bronchitis. *Thorax*. 1985;40:422-6.
  142. Avital A, Springer C, Bar-Yishay E, Godfrey S. Adenosine, methacholine, and exercise challenges in children with asthma or paediatric chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1995;50:511-6.
  143. Porsbjerg C, Brannan JD, Anderson SD, Backer V. Relationship between airway responsiveness to mannitol and to methacholine and markers of airway inflammation, peak flow variability and quality of life in asthma patients. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:43-50.
  144. Van Velzen E, van den Bos JW, Benckhuijsen JA, van Essel T, de Bruijn R, Aalbers R. Effect of allergen avoidance at high altitude on direct and indirect bronchial hyperresponsiveness and markers of inflammation in children with allergic asthma. *Thorax*. 1996;51:582-4.

145. Benckhuijsen J, van den Bos JW, van Velzen E, de Bruijn R, Aalbers R. Differences in the effect of allergen avoidance on bronchial hyperresponsiveness as measured by methacholine, adenosine 5'-monophosphate, and exercise in asthmatic children. *Pediatr Pulmonol.* 1996;22:147-53.
146. Van den Berge M, Kerstjens HA, Meijer RJ, de Reus DM, Koëter GH, Kauffman HF, et al. Corticosteroid-induced improvement in the PC20 of adenosine monophosphate is more closely associated with reduction in airway inflammation than improvement in the PC20 of methacholine. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1127-32.
147. Prosperini G, Rajakulasingam K, Cacciola RR, Spicuzza L, Rorke S, Holgate ST, et al. Changes in sputum counts and airway hyperresponsiveness after budesonide: monitoring anti-inflammatory response on the basis of surrogate markers of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110:855-61.
148. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181:852-7.
149. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J.* 1993;6:1368-70.
150. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet.* 1994;343:133-5.
151. Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, Barnes PJ. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol.* 1992;210:221-2.
152. Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:355-60.
153. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-12.
154. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature.* 1990;345:346-7.

155. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* 1991;42:1849–57.
156. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, et al. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest.* 1994;94:2231–6.
157. Robbins RA, Barnes PJ, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LD, et al. Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203:209–18.
158. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9:371–7.
159. Ricciardolo F, Sterk P, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev.* 2004;84:731–65.
160. Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 1994;266:E829–39.
161. Zetterquist W, Pedroletti C, Lundberg JO, Alving K. Salivary contribution to exhaled nitric oxide. *Eur Respir J.* 1999;13:327–33.
162. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: Recommendations. *Eur Respir J.* 1997;10:1683–93.
163. Recommendations for standardized procedures for the on-line and off-line measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:2104–17.
164. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Apr 15;171(8):912–30.

165. Kharitonov SA, Gonio F, Kelly C, Meah S, Barnes PJ. Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *Eur Respir J*. 2003;21:433–8.
166. Silkoff P. History, technical and regulatory aspects of exhaled nitric oxide. *J Breath Res*. 2008;2:037001.
167. Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. Nitric oxide in exhaled air. *Eur Respir J*. 1996;9:2671–80.
168. Alving K, Janson C, Nordvall L. Performance of a new hand-held device for exhaled nitric oxide measurement in adults and children. *Respir Res*. 2006;7:67.
169. Menzies D, Nair A, Lipworth BJ. Portable exhaled nitric oxide measurement: Comparison with the “gold standard” technique. *Chest*. 2007;131:410–4.
170. Michils A, Peché R, Baldassarre S, Mourid Z, Van Muylem A. Comparisons between portable and chemoluminescence exhaled nitric oxide measurements. *Eur Respir J*. 2008;32:243–4.
171. Kim SH, Moon JY, Kwak HJ, Kim S Il, Park DW, Kim JW, et al. Comparison of two exhaled nitric oxide analyzers: The NIOX MINO hand-held electrochemical analyzer and the NOA280i stationary chemiluminescence analyzer. *Respirology*. 2012;17:830–4.
172. Menzel L, Kosterev AA, Curl RF, Tittel FK, Gmachl C, Capasso F, et al. Spectroscopic detection of biological NO with a quantum cascade laser. *Appl Phys B*. 2001;72:859–63.
173. Hemmingsson T, Linnarsson D, Gambert R. Novel hand-held device for exhaled nitric oxide-analysis in research and clinical applications. *J Clin Monit Comp*. 2005;18:379–87.
174. Jilma B, Kastner J, Mensik C, Vondrovec B, Hildebrandt J, Krejcy K, et al. Sex differences in concentrations of exhaled nitric oxide and plasma nitrate. *Life Sci*. 1996;58:469–76.
175. Harris EA, Hunter ME, Seelye ER, Vedder M, Whitlock RM. Prediction of the physiological dead-space in resting normal subjects. *Clin Sci Mol Med*. 1973;45:375–86.

176. Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, Furlott HG, Hoffstein E, Wakita S, et al. Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:260-7.
177. Lundberg JON, Weitzberg E, Nordvall SL, Kuyslenstierna R, Lundberg JM, Alving K. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *Eur Respir J*. 1994;7:1501-4.
178. Högman M, Strömberg S, Schedin U, Frostell C, Hedenstierna G, Gustafsson LE. Nitric oxide from the human respiratory tract efficiently quantified by standardized single breath measurements. *Acta Physiol Scand*. 1997;159:345-6.
179. Koopman M, Arets HGM, Uiterwaal CSPM, van der Ent CK. Comparing 6 and 10 sec exhalation time in exhaled nitric oxide measurements in children. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44:340-4.
180. Gehring U, Oldenwening M, Brunekreef B, Wieringa MH, Kerkhof M, Smit HA, et al. The impact of ambient NO on online measurements of exhaled and nasal NO: the PIAMA study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009;20:665-72.
181. Malmberg LP, Petäys T, Haahtela T, Laatikainen T, Jousilahti P, Vartiainen E, et al. Exhaled nitric oxide in healthy nonatopic school-age children: determinants and height-adjusted reference values. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41:635-42.
182. Olin AC, Aldenbratt A, Ekman A, Ljungkvist G, Jungersten L, Alving K, et al. Increased nitric oxide in exhaled air after intake of a nitrate-rich meal. *Respir Med*. 2001;95:153-8.
183. Malinovschi A, Janson C, Holm L, Nordvall L, Alving K. Basal and induced NO formation in the pharyngo-oral tract influences estimates of alveolar NO levels. *J Appl Physiol*. 2009;106:513-9.
184. Taylor DR, Mandhane P, Greene JM, Hancox RJ, Filsell S, McLachlan CR, et al. Factors affecting exhaled nitric oxide measurements: the effect of sex. *Respir Res*. 2007;8:82.
185. Bodini A, Peroni D, Loiacono A, Costella S, Pigozzi R, Baraldi E, et al. Exhaled nitric oxide daily evaluation is effective in monitoring exposure to relevant allergens in asthmatic children. *Chest*. 2007;132:1520-5.

186. Bergmann-Hug K, Wirth R, Henseler M, Helbling A, Pichler WJ, Schnyder B. Effect of natural seasonal pollen exposure and repeated nasal allergen provocations on elevation of exhaled nitric oxide. *Allergy*. 2009;64:1629–34.
187. Sanders SP, Proud D, Permutt S, Siekierski ES, Yachechko R, Liu MC. Role of nasal nitric oxide in the resolution of experimental rhinovirus infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:697–702.
188. De Gouw HW, Grünberg K, Schot R, Kroes AC, Dick EC, Sterk PJ. Relationship between exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness following experimental rhinovirus infection in asthmatic subjects. *Eur Respir J*. 1998;11:126–32.
189. De Kluijver J, Evertse CE, Sont JK, Schrumpf JA, van Zeijl-van der Ham CJG, Dick CR, et al. Are rhinovirus-induced airway responses in asthma aggravated by chronic allergen exposure? *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:1174–80.
190. De Gouw HW, Hendriks J, Woltman AM, Twiss IM, Sterk PJ. Exhaled nitric oxide (NO) is reduced shortly after bronchoconstriction to direct and indirect stimuli in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:315–9.
191. Piacentini GL, Bodini A, Peroni DG, Miraglia del Giudice M, Costella S, Boner AL. Reduction in exhaled nitric oxide immediately after methacholine challenge in asthmatic children. *Thorax*. 2002;57:771–3.
192. Verbanck S, Kerckx Y, Schuermans D, Vincken W, Paiva M, Van Muylem A. Effect of airways constriction on exhaled nitric oxide. *J Appl Physiol*. 2008;104:925–30.
193. Olin A-C, Rosengren A, Thelle DS, Lissner L, Bake B, Torén K. Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample. *Chest*. 2006;130:1319–25.
194. Travers J, Marsh S, Aldington S, Williams M, Shirtcliffe P, Pritchard A, et al. Reference ranges for exhaled nitric oxide derived from a random community survey of adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:238–42.
195. Dressel H, de la Motte D, Reichert J, Ochmann U, Petru R, Angerer P, et al. Exhaled nitric oxide: independent effects of atopy, smoking,

respiratory tract infection, gender and height. *Respir Med.* 2008;102:962-9.

196. García-Río F, Ramírez M, Mediano O, Lores V, Rojo B, Villasante C, et al. Exhaled nitric oxide and airway caliber during exercise-induced bronchoconstriction. *Int J Sport Med.* 2006;27:905-10.
197. Tee AKH, Hui KP. Effect of spirometric maneuver, nasal clip, and submaximal inspiratory effort on measurement of exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Chest.* 2005;127:131-4.
198. Gabriele C, Pijnenburg MWH, Monti F, Hop W, Bakker ME, de Jongste JC. The effect of spirometry and exercise on exhaled nitric oxide in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16:243-7.
199. Dupont LJ, Rochette F, Demedts MG, Verleden GM. Exhaled Nitric Oxide Correlates with Airway Hyperresponsiveness in Steroid-naïve Patients with Mild Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:894-8.
200. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax.* 1998;53:91-5.
201. Lim S, Jatakanon A, John M, Gilbey T, O'connor BJ, Chung KF, et al. Effect of inhaled budesonide on lung function and airway inflammation. Assessment by various inflammatory markers in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:22-30.
202. Gibson PG, Henry RL, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. *Eur Respir J.* 2000;16:1008-15.
203. Mattes J, Storm Van's Gravesande K, Reining U, Alving K, Ihorst G, Henschen M, et al. NO in exhaled air is correlated with markers of eosinophilic airway inflammation in corticosteroid-dependent childhood asthma. *Eur Respir J.* 1999;13:1391-5.
204. Bousquet J, Chané P, Lacoste J, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* 1990;323:1033-9.



205. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: A randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:1715–21.
206. Warke TJ, Fitch PS, Brown V, Taylor R, Lyons JDM, Ennis M, et al. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax*. 2002;57:383–7.
207. Silkoff PE, Lent AM, Busacker AA, Katial RK, Balzar S, Strand M, et al. Exhaled nitric oxide identifies the persistent eosinophilic phenotype in severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:1249–55.
208. Berry MA, Shaw DE, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: An observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1175–9.
209. Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, Flannery EM, Hancox RJ, McLachlan CR, et al. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:738–43.
210. Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, et al. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: A randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:231–7.
211. Porsbjerg C, Lund TK, Pedersen L, Backer V. Inflammatory subtypes in asthma are related to airway hyperresponsiveness to mannitol and exhaled NO. *J Asthma*. 2009;46:606–12.
212. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, et al. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:473–8.
213. Deykin A, Massaro AF, Drazen JM, Israel E. Exhaled nitric oxide as a diagnostic test for asthma: online versus offline techniques and effect of flow rate. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1597–601.
214. Berkman N, Avital A, Breuer R, Bardach E, Springer C, Godfrey S. Exhaled nitric oxide in the diagnosis of asthma: comparison with bronchial provocation tests. *Thorax*. 2005;60:383–8.

215. Massaro a F, Gaston B, Kita D, Fanta C, Stamler JS, Drazen JM. Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:800–3.
216. Kharitonov S a., Yates DH, Chung KF, Barnes PJ. Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Eur Respir J*. 1996;9:196–201.
217. Kharitonov SA, Yates DH, Barnes J. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:454–7.
218. Melillo G, Bonini S, Cocco G, Davies RJ, de Monchy JG, Frølund L, et al. EAACI provocation tests with allergens. Report prepared by the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee on provocation tests with allergens. *Allergy*. 1997;52:1–35.
219. Moscato G, Pala G, Barnig C, De Blay F, Del Giacco SR, Folletti I, et al. EAACI consensus statement for investigation of work-related asthma in non-specialized centres. *Allergy*. 2012;67:491–501.
220. Moscato G, Pala G, Cullinan P, Folletti I, Gerth van Wijk R, Pignatti P, et al. EAACI Position Paper on assessment of cough in the workplace. *Allergy*. 2014;69:292–304.
221. Fernández-Nieto M, Sastre B, Sastre J, Lahoz C, Quirce S, Madero M, et al. Changes in sputum eicosanoids and inflammatory markers after inhalation challenges with occupational agents. *Chest*. 2009;136:1308–15.
222. Lemiere C. Induced sputum and exhaled nitric oxide as noninvasive markers of airway inflammation from work exposures. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7:133–7.
223. Girard F, Chaboillez S, Cartier A, Côté J, Hargreave FE, Labrecque M, et al. An effective strategy for diagnosing occupational asthma: use of induced sputum. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:845–50.
224. Obata H, Dittrick M, Chan H, Chan-Yeung M. Sputum eosinophils and exhaled nitric oxide during late asthmatic reaction in patients with western red cedar asthma. *Eur Respir J*. 1999;13:489–95.

225. Baur X, Barbinova L. Latex allergen exposure increases exhaled nitric oxide in symptomatic healthcare workers. *Eur Respir J*. 2005;25:309–16.
226. Allmers H, Chen Z, Barbinova L, Marczynski B, Kirschmann V, Baur X. Challenge from methacholine, natural rubber latex, or 4,4-diphenylmethane diisocyanate in workers with suspected sensitization affects exhaled nitric oxide [change in exhaled NO levels after allergen challenges]. *Int Arch Occup Env Heal*. 2000;73:181–6.
227. Lund MB, Oksne PI, Hamre R, Kongerud J. Increased nitric oxide in exhaled air: an early marker of asthma in non-smoking aluminium potroom workers? *Occup Env Med*. 2000;57:274–8.
228. Olin AC, Ljungkvist G, Bake B, Hagberg S, Henriksson L, Torén K. Exhaled nitric oxide among pulpmill workers reporting gassing incidents involving ozone and chlorine dioxide. *Eur Respir J*. 1999;14:828–31.
229. Ferrazzoni S, Scarpa MC, Guarnieri G, Corradi M, Mutti A, Maestrelli P. Exhaled nitric oxide and breath condensate pH in asthmatic reactions induced by isocyanates. *Chest*. 2009;136:155–62.
230. Maniscalco M, Grieco L, Galdi A, Lundberg JON, Sofia M. Increase in exhaled nitric oxide in shoe and leather workers at the end of the work-shift. *Occup Med (Oxford, England)*. 2004;54:404–7.
231. Sundblad BM, Larsson BM, Palmberg L, Larsson K. Exhaled nitric oxide and bronchial responsiveness in healthy subjects exposed to organic dust. *Eur Respir J*. 2002;20:426–31.
232. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:1107–36.
233. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:309–29.
234. Nair P, Kjarsgaard M, Armstrong S, Efthimiadis A, O'Byrne PM, Hargreave FE. Nitric oxide in exhaled breath is poorly correlated to sputum eosinophils in patients with prednisone-dependent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:404–6.

235. Prieto L, Esnal S, Lopez V, Barato D, Rojas R, Marín J. Maximal response plateau to adenosine 5'-monophosphate in asthma. Relationship with the response to methacholine, exhaled nitric oxide, and exhaled breath condensate pH. *Chest*. 2009;135:1521-6.
236. Holgate ST, Cushley MJ, Mann JS, Hughes P, Church MK. The action of purines on human airways. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1986;280:240-52.
237. De Meer G, Heederik DJ, Postma DS. Bronchial responsiveness to adenosine 5'-monophosphate (AMP) and methacholine differ in their relationship with airway allergy and baseline FEV(1). *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:327-31.
238. Polosa R, Ciamarra I, Mangano G, Prosperini G, Pistorio MP, Vancheri C, et al. Bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation markers in nonasthmatics with allergic rhinitis. *Eur Respir J*. 2000;15:30-5.
239. Phillips GD, Ng WH, Church MK, Holgate ST. The response of plasma histamine to bronchoprovocation with methacholine, adenosine 5'-monophosphate, and allergen in atopic nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141:9-13.
240. De Meer G, Marks GB, Postma DS. Direct or indirect stimuli for bronchial challenge testing: What is the relevance for asthma epidemiology? *Clin Exp Allergy*. 2004;34:9-16.
241. Grootendorst DC, Dahlén SE, Van Den Bos JW, Duiverman EJ, Veselic-Charvat M, Vrijlandt EJ, et al. Benefits of high altitude allergen avoidance in atopic adolescents with moderate to severe asthma, over and above treatment with high dose inhaled steroids. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:400-8.
242. Barnes PJ, Basbaum CB, Nadel JA. Autoradiographic localization of autonomic receptors in airway smooth muscle. Marked differences between large and small airways. *Am Rev Respir Dis*. 1983;127:758-62.
243. Mak JC, Barnes PJ. Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141:1559-68.

244. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J*. 2002;19:879–85.
245. Michils A, Elkrim Y, Haccuria A, Van Muylem A. Adenosine 5'-monophosphate challenge elicits a more peripheral airway response than methacholine challenge. *J Appl Physiol*. 2011;110:1241–7.
246. Manso L, Madero MF, Ruiz-García M, Fernández-Nieto M, Sastre J. Comparison of bronchial hyperresponsiveness to methacholine and adenosine and airway inflammation markers in patients with suspected asthma. *J Asthma*. 2011;48:335–40.
247. Suh DI, Lee JK, Kim CK, Koh YY. Methacholine and adenosine 5'-monophosphate (AMP) responsiveness, and the presence and degree of atopy in children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22:101–6.
248. Suh DI, Lee JK, Kim CK, Koh YY. Bronchial hyperresponsiveness to methacholine and adenosine 5'-monophosphate, and the presence and degree of atopy in young children with asthma. *Clin Exp Allergy*. 2011;41:338–45.
249. Luks VP, Vandemheen KL, Aaron SD. Confirmation of asthma in an era of overdiagnosis. *Eur Respir J*. 2010;36:255–60.
250. Goldstein MF, Veza BA, Dunskey EH, Dvorin DJ, Belecanech GA, Haralabatos IC. Comparisons of peak diurnal expiratory flow variation, postbronchodilator FEV(1) responses, and methacholine inhalation challenges in the evaluation of suspected asthma. *Chest*. 2001;119:1001–10.
251. Payne DNR, Adcock IM, Wilson NM, Oates T, Scallan M, Bush A. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1376–81.
252. Alvarez-Puebla M, Olaguibel Rivera J, Almudevar E, Echegoyen A, De Esteban Chocarro B, Cambra K. Cutoff Point for Exhaled Nitric Oxide Corresponding to 3 % Sputum Eosinophils. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25:107–11.
253. Wagener a. H, de Nijs SB, Lutter R, Sousa a. R, Weersink EJM, Bel EH, et al. External validation of blood eosinophils, FENO and serum

periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax*. 2015;70:115–20.

254. Perzanowski MS, Yoo Y. Exhaled Nitric Oxide and Airway Hyperresponsiveness to Adenosine 5'-monophosphate and Methacholine in Children with Asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2015;166:107–13.
255. Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest*. 2003;123:751–6.
256. Malmberg LP, Pelkonen AS, Haahtela T, Turpeinen M. Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probable asthma. *Thorax*. 2003;58:494–9.
257. Jerzyńska J, Majak P, Janas A, Stelmach R, Stelmach W, Smejda K, et al. Predictive value of fractional nitric oxide in asthma diagnosis-subgroup analyses. *Nitric Oxide*. 2014;40:87–91.
258. Schneider A, Faderl B, Schwarzbach J, Welker L, Karsch-Völke M, Jörres R a. Prognostic value of bronchial provocation and FENO measurement for asthma diagnosis - Results of a delayed type of diagnostic study. *Respir Med*. 2014;108:34–40.
259. Florentin A, Acouetey D-S, Remen T, Penven E, Thaon I, Zmirou-Navier D, et al. Exhaled nitric oxide and screening for occupational asthma in two at-risk sectors: bakery and hairdressing. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18:744–50.
260. Fukuhara A, Saito J, Sato S, Sato Y, Nikaido T, Saito K, et al. Validation study of asthma screening criteria based on subjective symptoms and fractional exhaled nitric oxide. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011;107:480–6.
261. Cordeiro D, Rudolphus A, Snoey E, Braunstahl G-J. Utility of nitric oxide for the diagnosis of asthma in an allergy clinic population. *Allergy Asthma Proc*. 2011;32:119–26.
262. Voutilainen M, Malmberg LP, Vasankari T, Haahtela T. Exhaled nitric oxide indicates poorly athlete's asthma. *Clin Respir J*. 2013;7:347–53.

263. Woo S Il, Lee JH, Kim H, Kang JW, Sun YH, Hahn YS. Utility of fractional exhaled nitric oxide (F ENO) measurements in diagnosing asthma. *Respir Med.* 2012;106:1103–9.
264. Schneider A, Schwarzbach J, Faderl B, Welker L, Karsch-Völk M, Jörres RA. FENO measurement and sputum analysis for diagnosing asthma in clinical practice. *Respir Med.* 2013;107:209–16.
265. Li Z, Qin W, Li L, Wu Q, Wang Y, Fortuna AM, et al. Diagnostic accuracy of exhaled nitric oxide in asthma : a meta-analysis of 4,691 participants. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:8516–24.
266. See KC, Christiani DC. Normal values and thresholds for the clinical interpretation of exhaled nitric oxide levels in the US general population: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2010. *Chest.* 2013;143:107–16.
267. Dinh-Xuan a. T, Annesi-Maesano I, Berger P, Chambellan A, Chanez P, Chinnet T, et al. Contribution of exhaled nitric oxide measurement in airway inflammation assessment in asthma. A position paper from the French Speaking Respiratory Society. *Rev Mal Respir.* 2015;32:193–215.
268. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, et al. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:453–9.
269. Hanania N a., Wenzel S, Roseñ K, Hsieh HJ, Mosesova S, Choy DF, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: An analysis of biomarkers in the EXTRA study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:804–11.
270. De Monchy JG, Kauffman HF, Venge P, Koëter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, et al. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis.* 1985;131:373–6.
271. Durham SR, Graneek BJ, Hawkins R, Taylor AJ. The temporal relationship between increases in airway responsiveness to histamine and late asthmatic responses induced by occupational agents. *J Allergy Clin Immunol.* 1987;79:398–406.
272. Roos AB, Mori M, Grönneberg R, Österlund C, Claesson HE, Wahlström J, et al. Elevated exhaled nitric oxide in allergen-

provoked asthma is associated with airway epithelial iNOS. *PLoS One*. 2014;9:e90018.

273. Lemièrè C, Chaboillez S, Malo JL, Cartier A. Changes in sputum cell counts after exposure to occupational agents: what do they mean? *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:1063–8.
274. Sastre J, Costa C, Potro MG, Aguado E, Mahillo I. Changes in Exhaled Nitric Oxide After Inhalation Challenge With Occupational Agents. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23:421–7.
275. Walters GI, Moore VC, McGrath EE, Burge S. Fractional exhaled nitric oxide in the interpretation of specific inhalational challenge tests for occupational asthma. *Lung*. 2014;192:119–24.
276. Lemièrè C, NGuyen S, Sava F, D'Alpaos V, Huaux F, Vandenplas O. Occupational asthma phenotypes identified by increased fractional exhaled nitric oxide after exposure to causal agents. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:1063–7.
277. Quirce S, Lemièrè C, de Blay F, del Pozo V, Gerth Van Wijk R, Maestrelli P, et al. Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. *Allergy*. 2010;65:445–58.
278. Vandenplas O, Suojalehto H, Aasen TB, Baur X, Burge PS, De Blay F, et al. Specific inhalation challenge in the diagnosis of occupational asthma: Consensus statement. *Eur Respir J*. 2014;43:1573–87.